



TAMPEREEN  
AMMATTIKORKEAKOULU

# **RAVINTEIDEN VAIKUTUS POLY- $\beta$ -HYDROKSIBUTYRAATIN TUOTANTOON METANOTROFIEN AVULLA**

Tiina Siukola

Opinnäytetyö  
Joulukuu 2015  
Laboratorioalan koulutusohjelma



## TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Laboratorioalan koulutusohjelma

SIUKOLA, TIINA:

Ravinteiden vaikutus poly- $\beta$ -hydroksibutyraatin tuotantoon metanotrofien avulla

Opinnäytetyö 46 sivua, joista liitteitä 6 sivua  
Joulukuu 2015

---

Poly- $\beta$ -hydroksibutyraatti on biopolymeeri, jota prokaryootit syntetisoivat hiili- ja energiavarastokseen epäsuotuisissa kasvuoloissa. Polymeeri muistuttaa ominaisuuksiltaan tavanomaisia petrokemian polymeereja. Metanotrofit ovat bakteereja, joita esiintyy kaikenlaisissa luonnon ekosysteemeissä. Ne hapettavat ympäristöissä syntyvää metaania ja vähentävät näin ilmakehään vapautuvan kaasun määrää. Bakteerit tuottavat poly- $\beta$ -hydroksibutyraattia metaanista, kun niiden kasvualustasta puuttuu jokin ravinne.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää, miten eri ravinteet vaikuttavat eksponentiaalisessa kasvunvaiheessa olevien metanotrofien metaaninhapetukseen ja poly- $\beta$ -hydroksibutyraatin tuotantoon. Kasvualustan ravinteiden optimoinnin avulla voidaan tuottaa poly- $\beta$ -hydroksibutyraattia metaanista muovien raaka-aineeksi *in situ* entistä tehokkaammin. Tarkoituksena oli kasvattaa kaatopaikkamaasta rikastettua metanotrofi-populaatiota eksponentiaaliseen kasvunvaiheeseen ja jatkaa kasvatusta mediuumeissa, joista oli poistettu jokin ravinne. Tällöin bakteerit tuottavat poly- $\beta$ -hydroksibutyraattia. Työ suoritettiin Tampereen teknillisellä yliopistolla Kemian ja biotekniikan laitoksella.

Rikastettua metanotrofi-populaatiota kasvatettiin metaani-ilmakaasufaasissa mediuumeissa, joista oli poistettu sulfaatti, kalium, magnesium, nitraatti tai fosfaatti. Lisäksi tehtiin toinen nitraatiton kasvatussarja kaasufaasissa, jossa typen määrää rajoitettiin. Syntyneen polymeerin määrä mitattiin inkuboinnin päätyttyä kylmäkuivatusta biomassasta kaasukromatografisesti. Kokeet tehtiin suljetuina pullokasvatuksina. Nitraatiton medium oli poly- $\beta$ -hydroksibutyraatin saannon kannalta selvästi paras. Kaasufaasin typen rajoittaminen ei tehostanut biopolymeerin tuottoa eikä metaaninhapetusta. Metaaninhapetuksessa ei ollut merkittäviä eroja ravinteikkaan, magnesiumittoman, kaliumittoman, fosfaatittoman ja sulfaatittoman kasvatusalustan välillä. Nitraatittomissa mediuumeissa metanotrofit hapettivat metaania selvästi muita kasvatuksia vähemmän.

Saadut tulokset tukevat aiemmin tehtyjä tutkimuksia nitraatittomien kasvatusmediumien osalta. Joissakin tutkimuksissa on saatu poikkeavia tuloksia muita ravinteita käytettäessä. Tässä työssä saatiin selvitettyä, että tutkitun kaatopaikkamaan metanotrofien poly- $\beta$ -hydroksibutyraatin tuotannolle optimaalisinta on poistaa kasvatusalustasta nitraatti. Lisätutkimuksia tarvitaan metanotrofi-populaation lajien selvittämisessä ja kaasufaasin typen vaikutusten tarkentamisessa.

---

Asiasanat: poly- $\beta$ -hydroksibutyraatti, PHB, metanotrofi, metaaninhapetus, ravinteet

## ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Tampere University of Applied Sciences  
Degree Programme in Laboratory Sciences

SIUKOLA, TIINA:

The Effect of Nutrients on Production of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate with Methanotrophic Bacteria

Bachelor's thesis 46 pages, appendices 6 pages  
December 2015

---

Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate is a biopolymer that prokaryotes synthesize for carbon and energy reserve in unfavorable growth conditions. The attributes of the polymer resemble traditional petrochemical polymers' features. Methanotrophic bacteria are found in all kinds of natural ecosystems. They oxidize methane originating from environments and therefore reduce the amount of gas released to the atmosphere. Bacteria produce poly- $\beta$ -hydroxybutyrate from methane when the amount of nutrient is limited in their growth medium.

The objective of this thesis was to examine the effects of limiting nutrients on the methane oxidizing potential and production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in exponential phase methanotrophic bacteria. By optimizing the nutrients in the growth medium, the production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate from methane to plastic raw material *in situ* can be enhanced. The purpose was to cultivate methanotrophic bacteria enriched from landfill soil to exponential growth phase and continue culturing them in nutrient-free medium. Under these conditions bacteria produce poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. The study was performed at the department of Chemistry and Biotechnology of the Tampere University of Technology.

The enriched methanotrophic bacteria population was cultivated in a gas phase containing methane and air, in a medium that lacked sulfate, potassium, magnesium, nitrate or phosphate. Another culturing was carried out in a nitrate-free medium within a nitrogen-limited gas phase. The amount of polymer produced was determined after incubation from lyophilized biomass by gas chromatography. The experiments were performed as batch cultures. The nitrate-free medium was the best option considering the poly- $\beta$ -hydroxybutyrate yield. No significant differences were observed in the bacteria methane oxidizing potential when comparing the nutrient-rich, magnesium-free, potassium-free, phosphate-free and sulfate-free medium. The methanotrophic bacteria oxidized methane distinctly less in nitrate-free medium.

The accomplished results are in accordance with previous studies performed with nitrate-free medium. Other studies have resulted in different outcomes through the use of the other nutrients. In this thesis it was indicated the methanotrophic bacteria in the soil of this particular landfill produce poly- $\beta$ -hydroxybutyrate most efficiently when using nitrate-free medium. Further experiments are required to specify the species in the methanotrophic bacteria population and to define the effects of molecular nitrogen exposure.

---

Key words: poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, PHB, methanotrophic bacteria, methane oxidation, nutrients

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	METANOTROFIEN HYÖDYNTÄMINEN POLY- $\beta$ -HYDROKSIBUTYRAATIN TUOTANNOSSA.....	7
2.1	Poly- $\beta$ -hydroksibutyraatti .....	7
2.2	Metanotrofit .....	8
2.3	Metanotrofien poly- $\beta$ -hydroksibutyraatin syntetisointi .....	10
3	POLY- $\beta$ -HYDROKSIBUTYRAATIN TUOTTAMINEN SULJETUSSA SYSTEEMISSÄ METANOTROFIEN AVULLA .....	14
3.1	Bakteerien pullokasvatus ja kasvun määrittäminen .....	14
3.2	Poly- $\beta$ -hydroksibutyraatin määrittäminen biomassasta .....	16
3.3	Metaanin jakautuminen kaasu- ja nestefaasiin .....	18
4	MATERIAALIT JA MENETELMÄT .....	19
4.1	Metanotrofipopulaation eristys .....	19
4.2	Metanotrofien kasvukäyrä ja optisen tiheyden standardisuora .....	19
4.3	Poly- $\beta$ -hydroksibutyraatin tuottokokeet ja biomassan keräys .....	20
4.4	Poly- $\beta$ -hydroksibutyraatin uutto ja analysointi .....	25
5	TULOKSET .....	28
5.1	Metanotrofien kasvukäyrä ja optisen tiheyden standardisuora .....	28
5.2	Ravinteettomien mediumien pH:t ja sähkönjohtokyvyt .....	29
5.3	Metanotrofien metaaninhapetus ja poly- $\beta$ -hydroksibutyraatin tuotto .....	30
6	POHDINTA.....	34
	LÄHTEET .....	38
	LIITTEET .....	41
	Liite 1. NMS-kasvatusmedium (NCIMB 2015) .....	41
	Liite 2. Kasvukäyrän määrittämisen absorbanssit .....	43
	Liite 3. Optisen tiheyden standardisuoran määrittämisen absorbanssit .....	44
	Liite 4. Mediumien pH:t ja sähkönjohtavuudet .....	45
	Liite 5. Hapetetun metaanin määrä ja biomassasta uutetun PHB:n konsentraatio kasvatuspulloittain .....	46

**LYHENTEET JA TERMIT**

3-HB	3-hydroksibutyraatti, PHB:n monomeeri
Asetyyli-KoA	asetyylikoentsyymi-A, solun aineenvaihdunnan välituote
GC-FID	kaasukromatografilaitteisto liekki-ionisaatiodetektorilla
GC-TCD	kaasukromatografilaitteisto lämmönjohtokykydetektorilla
NMS	<i>nitrate mineral salts</i> - medium, ravinteikas kasvatusmedium
RPM	<i>revolutions per minute</i> , kierroksia minuutissa
RCF	suhteellinen sentrifugaalivoima, aineeseen kohdistuva voima sentrifugissa
P(3HB)	poly-3-hydroksibutyraatti, biopolymeeri
PHA	polyhydroksialkanoaatti, biopolymeeri
PHB	poly- $\beta$ -hydroksibutyraatti, biopolymeeri

## 1 JOHDANTO

Metaani on yksi haitallisimmista kaasuista ilmastonmuutoksen kannalta ja sen määrä ilmakehässä on kasvanut voimakkaasti viimeisten satojen vuosien aikana. Pitoisuuden nousuun ovat vaikuttaneet pääasiassa maatalouden ja teollisuuden päästöt. Toinen nykyajan merkittävä ympäristöongelma on syntyvän jätteen määrä. Muoveja käytetään maailmassa miljoonia tonneja joka päivä. Perinteiset öljypohjaiset muovit jäävät luontoon pitkiksi ajoiksi ja siksi niille kehitetään biohajoavia korvaajia.

Poly- $\beta$ -hydroksibutyraatti on polyhydroksialkanoaatteihin kuuluva biopolymeeri, jolla on samankaltaisia ominaisuuksia kuin petrokemian perinteisillä polymeereillä. Monet bakteerit syntetisoivat sitä luonnostaan yksihiilisistä yhdisteistä. Tällä hetkellä poly- $\beta$ -hydroksibutyraatin teollinen tuottaminen on kallista, eivätkä se, tai muut biopolymeerit ole syrjäyttäneet tavanomaisten polymeerien käyttöä muovien valmistuksessa. Metanotrofit ovat muun muassa kaatopaikoilla eläviä bakteereja, jotka kykenevät käyttämään metaania ainoana hiilenlähteenään. Ne syntetisoivat poly- $\beta$ -hydroksibutyraattia hiili- ja energiavarastokseen, kun kasvualustassa on hiilenlähde, mutta jokin ravinne puuttuu. Syntyvän poly- $\beta$ -hydroksibutyraatin määrään vaikuttavat kasvualustasta puuttuva ravinne, tarjolla oleva hiilenlähde ja metanotrofipopulaation lajit. Tällä hetkellä kehitetään menetelmiä, joilla voitaisiin valmistaa polyhydroksialkanoaatteja bakteerien avulla suoraan metaanin syntypaikoilla.

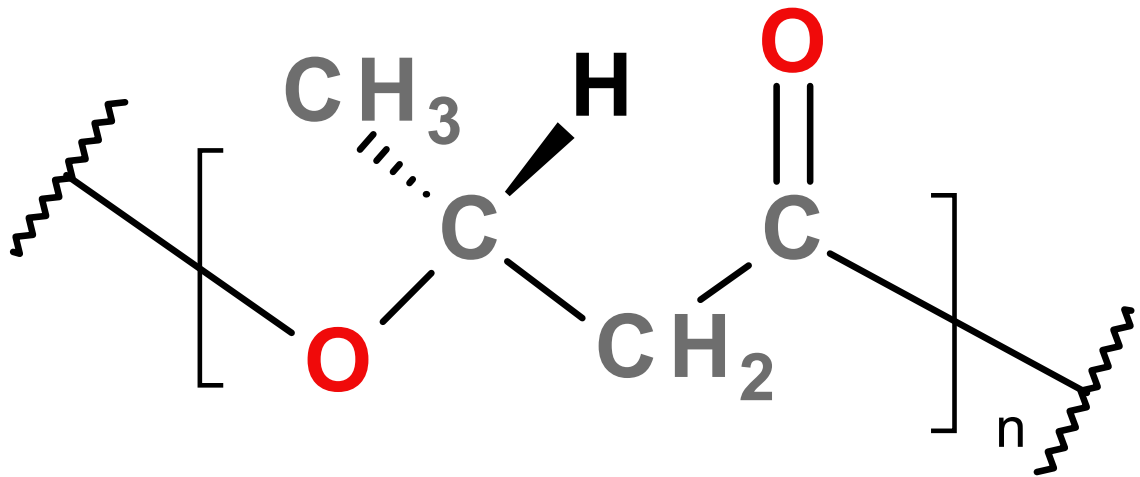
Tämän opinnäytetyön tavoitteena on selvittää, miten eri ravinteet vaikuttavat eksponentiaalisessa kasvunvaiheessa olevien metanotrofien metaaninhapetukseen ja poly- $\beta$ -hydroksibutyraatin tuotantoon, kun substraattina on metaani. Kasvualustan ravinteiden optimoinnin avulla voidaan tuottaa poly- $\beta$ -hydroksibutyraattia metaanista muovien raaka-aineeksi *in situ* entistä tehokkaammin. Opinnäytetyön tarkoituksena on kasvattaa rikastettua metanotrofipopulaatiota eksponentiaaliseen kasvunvaiheeseen ja jatkaa kasvatusmediumissa, joista on poistettu nitraatti, sulfaatti, fosfaatti, magnesium tai kalium. Tällöin bakteerit tuottavat poly- $\beta$ -hydroksibutyraattia, jonka määrä mitataan inkuboinnin päätyttyä kylmäkuivatusta biomassasta kaasukromatografisesti. Kokeet tehdään suljettuina pullokasvatuksina. Opinnäytetyö tehtiin Tampereen teknillisen yliopiston Kemian ja biotekniikan laitoksella syksyn 2015 aikana. Työn tuloksia hyödynnetään työn ohjaajan Susanna Maanojan väitöskirjatyössä.

## 2 METANOTROFIEN HYÖDYNTÄMINEN POLY- $\beta$ -HYDROKSIBUTYRAATIN TUOTANNOSSA

### 2.1 Poly- $\beta$ -hydroksibutyraatti

Poly- $\beta$ -hydroksibutyraatti (PHB) kuuluu polyhydroksialkanoaatteihin (PHA). Polyhydroksialkanoaatit ovat biohajoavia ja bioyhteensopivia polymeereja, joilla on suuri molekyylipaino. Erilaiset prokaryootit syntetisoivat ja varastoivat niitä epätasapainoisissa kasvuoloissa. Nykyään polyhydroksialkanoaatteja tunnetaan paljon ja ne muistuttavat ominaisuuksiltaan kestonmuoveja, kuten polypropyleenia ja polyetyleenia. Sopivissa luonnonolosuhteissa biopolymeerit hajoavat nopeasti ja kokonaan. Vaikka biopolymeerien valmistuskustannukset ovat laskeneet paljon 1990-luvun alusta, niiden teollinen tuotanto on edelleen paljon kalliimpaa kuin öljypohjaisten muovien. Tällä hetkellä kiinteää jätettä syntyy valtavia määriä ja fossiilisten polttoaineiden palamisessa syntyvät saasteet ovat vakava ongelma, joten biohajoavien polymeerien tuotanto on hyvin houkuttelevaa. Niillä pyritään korvaamaan perinteisten muovien raaka-aineita. (Brandl, Gross, Lenz & Fuller 2005, 77–78; Khosravi-Darani, Mokhtari, Amai & Tanaka, 1407–1408; Sudesh & Abe 2010, 1.)

PHB on ensimmäinen havaittu PHA ja sitä on myös tutkittu eniten (Khosravi-Darani ym. 2013, 1408). Vuonna 1927 eristettiin maaperän bakteereista 3-hydroksibutaanihappoa (3HB) eli poly-3-hydroksibutyraatin monomeeria. Poly-3-hydroksibutyraatin (P(3HB)) eli poly- $\beta$ -hydroksibutyraatin (PHB) (kuvio 1, Sudesh & Abe 2010, 28, muokattu) merkitys bakteereille todennettiin vasta vuonna 1958. Tällöin havaittiin, että biomassaan kerääntyi biopolymeeria erityisen paljon, kun kasvatusalustan glukoosi-nitraattisuhde oli korkea. Syntyneiden PHB-molekyylien huomattiin pilkkoutuvan, kun ulkoiset hiilen- ja energianlähteet puuttuivat. Seuraavien vuosien aikana PHB:a tutkittiin paljon. 1970-luvun alkuun mennessä PHB:n ja muiden polyhydroksialkanoaattien ominaisuuksia oli analysoitu kattavasti, mutta niiden tuottamista erilaisia hyödykkeitä varten ei kaivattu. Öljypohjaisten muovien valmistus oli paljon helpompaa ja halvempaa. 1970-luvun aikana raakaöljyn hinta kuitenkin moninkertaistui ja kiinnostus polyhydroksialkanoaattien tutkimiseen myös ihmisten käyttöä varten kasvoi. 1990-luvulla oli jo myynnissä kahta biopolymeeria. (Braunegg, Lefebvre & Genser 1998, 127–131.)



KUVIO 1. Poly-3-hydroksibutyraatin rakennekaava (Sudesh & Abe 2010, 28, muokattu)

Homopolymeerinä PHB on erittäin kiteistä, melko jäykkää ja haurasta. Sen sulamispiste on noin 180 celsiusastetta ja kiderakenne ortorombinen. Mekaanisilta ominaisuuksiltaan ja vetolujuudeltaan se muistuttaa isotaktista polypropyleeniä. Polymeerien monomeereilla on sama konfiguraatio, mutta PHB:n murtovenymä on selvästi polypropyleeniä matalampi. Lisäämällä rakenteeseen muita hydroksialkanoaatteja saadaan polymeerin ominaisuuksia parannettua. Muodostettuja biopolymeereja voidaan käsitellä ja muovata kuten tavanomaisia kestopuoveja. (Doi 1997, 79–81.)

Bioyhteesopivuutensa ansiosta PHB:a voitaisiin käyttää lääketieteessä esimerkiksi kudosisplanteissa ja haavansidonnassa sekä -ompelussa. Farmasiassa sen avulla pystyttäisiin vapauttamaan lääkkeitä hallitusti verenkiertoon. Biopolymeeria olisi mahdollista hyödyntää myös ruoan pakkausmateriaalina ja maatalouden sovelluksissa, mikä olisi käytännöllistä, sillä PHB hajoaa luonnossa. (Wendlandt, Geyer, Mirschel & Hemidi 2005, 119–120.)

## 2.2 Metanotrofit

Fysiologisesti luokiteltuna metanotrofit kuuluvat metylotrifeihin. Metylotrifeit ovat bakteereja, jotka käyttävät yksihiilisiä yhdisteitä energian- ja hiilenlähteinään. Ryhmään kuuluu esimerkiksi metanolia ja metyloituja amiineja käyttäviä bakteereja. Niille kaikille on yhteistä formaldehydin assimilaatio solunsisäisen hiilen lähteenä. Metanotrofit



kykenevät käyttämään ainoana formaldehydin- eli hiilenlähteenään metaania. (Hanson & Hanson 1996, 439.)

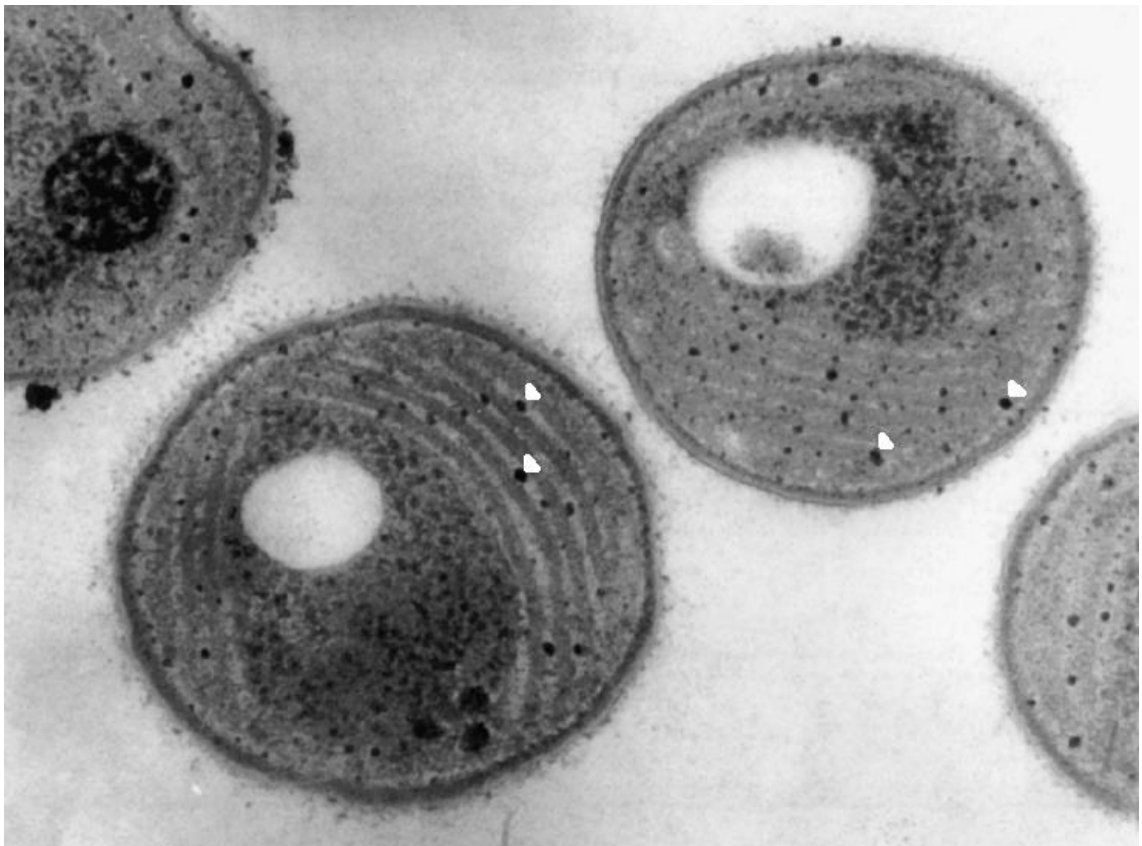
Metanotrofit ovat proteobakteerien pääjaksoon kuuluva monimuotoinen ryhmä gramnegatiivisia bakteereja. Niitä esiintyy kaikkialla erilaisissa luonnon ekosysteemeissä kuten soilla, merissä ja lehtimetsissä. Erityisesti niitä tavataan ympäristöissä, joissa metaania syntyy paljon, kuten kaatopaikoilla ja kaasuputkien läheisyydessä. (Hanson & Hanson 1996, 439–443; Khosravi-Darani ym. 2013, 1410.) Normaalisti metanotrofit hapettavat metaanin formaldehydin kautta hiilidioksidiksi ja vedeksi sekä uudeksi biomassaksi (Hanson & Hanson 1996, 440–459).

Bakteerit jaetaan tyypin I ja tyypin II metanotrofeihin muun muassa niiden formaldehydin assimilaation, pääasiallisen hiilenlähteen ja fysiologisten sekä morfologisten piirteiden mukaan (Hanson & Hanson 1996, 442). Tyypin I metanotrofit kasvavat tehokkaasti suotuisissa olosuhteissa ja kuolevat nopeasti stressaavissa oloissa. Niitä esiintyy usein lukumäärällisesti enemmän kuin tyypin II metanotrofeja, kun ympäristön metaanipitoisuus on matala ja molekulaarista typpeä sekä kuparia on runsaasti. Tyypin II metanotrofit taas kasvavat yleisesti hitaammin ja selviytyvät paremmin myös pH:n madaltuessa. Suuri metaanipitoisuus ja hapen sekä typen rajoittaminen suosivat tyypin II metanotrofeja. Sekä tyypin I että II metanotrofit tuottavat poly- $\beta$ -hydroksibutyraattia, mutta tyypin II bakteerit ovat siinä tehokkaampia. Suurin osa poly- $\beta$ -hydroksibutyraattia tuottavista metanotrofeista onkin tyyppiä II. (Hanson & Hanson 1996, 439; Khosravi-Darani ym. 2013, 1410, 1413.)

Metanotrofeilla on merkittävä rooli ilmaston lämpenemisen lieventämisessä. Metaani on yksi haitallisimmista kasvihuonekaasuista ilmastomuutoksen kannalta, sillä se absorboi tehokkaasti lämpöä. Sen pitoisuus ilmakehässä on noussut 1,5-kertaiseksi parin viime vuosisadan aikana ja määrän uskotaan nousevan edelleen. Kasvu johtuu pääasiassa maataloudessa ja teollisuudessa syntyvistä päästöistä. Luonnossa metaania syntyy eniten kosteikoilla, soilla ja kaatopaikoilla. Metanotrofit hapettavat suurimman osan hapetomissa oloissa syntyvästä metaanista ennen kuin se pääsee ilmakehään. (Hanson & Hanson 1996, 449, 463; Khosravi-Darani ym. 2013, 1410; Laurila 2013.)

### 2.3 Metanotrofien poly- $\beta$ -hydroksibutyraatin syntetisointi

Metanotrofit syntetisoivat PHB-molekyylejä hiili- ja energiavarastoikseen, kun niiden kasvualustasta puuttuu jokin ravinne tai hivenaine. Polymeeri tarjoaa bakteereille selviytymisedun myöhemmin hiilenpuutteen sattuessa, sillä siitä saadaan hiiltä ja energiaa solujen käyttöön. PHB:n tuotannossa käytettyjä ravinteita ja hivenaineita ovat esimerkiksi happi, typpi, fosfaatti, nitraatti, sulfaatti, magnesium, kalium ja kupari. Näistä kasvualustan typen määrän rajoittaminen on eniten tutkittu. (Asenjo, Schmidt, Andersen & Andrews 1995, 497; Helm, Wendlandt, Jechorek & Stottmeister 2008, 1055; Zúñiga, Morales, Le Borgne & Revah 2011, 876–877.) Elektronimikroskoopilla PHB näkyy soluissa erillisinä rakeina (kuva 1, Wendlandt ym. 2001, 130; Zhang ym. 2008, 105).

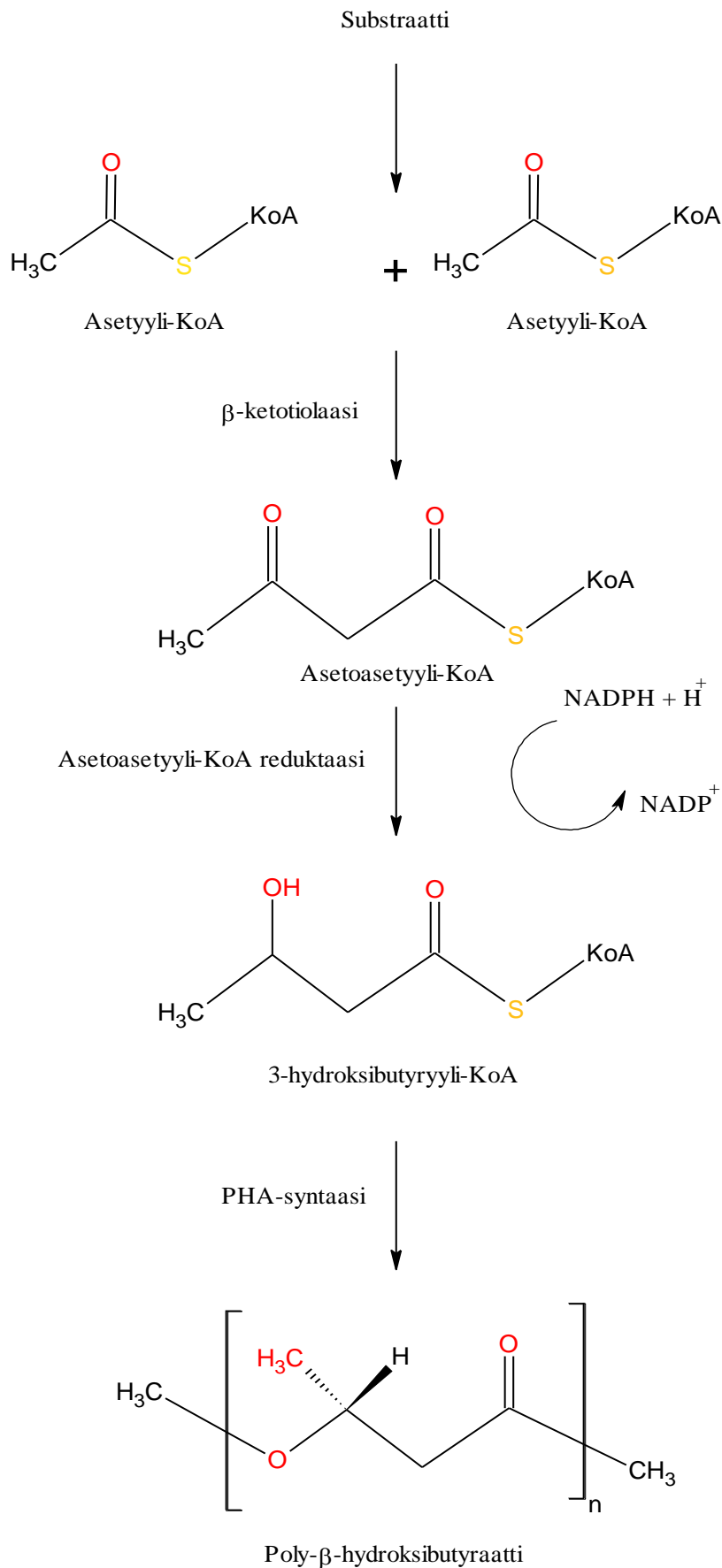


KUVA 1. Elektronimikroskooppikuvassa PHB erottuu bakteerisoluissa erillisinä rakeina (Wendlandt ym. 2001, 130, muokattu)

Metanotrofit tuottavat polymeeria asetyylikoentsyymi-A:sta (asetyyli-KoA), kun niillä on käytössään hiilenlähde ja paljon pelkistynyttä nikotiiniamidiadeniin nukleotidifosfaattia (NADPH), mutta kasvualustasta puuttuu jokin ravinne (Asenjo ym. 1995, 497; Sudesh & Abe 2010, 6). Laboratoriotutkimuksissa polymeerin tuottamisessa voidaan

käyttää puhdasviljelmiä kuten Asenjon ym. (1995, 497–498) tutkimuksessa tai sekaviljelmiä kuten Wendlandtin ym. (2001, 128) kokeissa. PHB:n synteesireitti bakteerisolulissa on selvitetty yksityiskohtaisesti *Cupriavidus necatorilla*, joka on muissakin polyhydroksialkanaattien biosynteesitutkimuksissa paljon käytetty proteobakteeri (Sudesh & Abe 2010, 6).

Suuntaa-antava kaaviokuva PHB:n synteesireitistä on esitetty kuviossa (2) (Khosravi-Darani ym. 2013, 1414; Sudesh & Abe 2010, 6). Bakteerit saavat metaanista tai muusta substraatista käyttöönsä asetyylikoentsyymi-A:ta. Asetyyli-KoA:n synteesireitti riippuu hiilen assimilaatioreitistä, joka on erilainen metanotrofityypeillä I ja II. Kahdesta asetyyli-KoA-molekyylistä bakteerit kondensoivat yhden asetoasetyyli-KoA-molekyylin  $\beta$ -ketotialaasin avulla. Samalla yksi koentsyymi-A vapautuu käyttöön. Asetoasetyyli-koentsyymi-A-reduktaasi pelkistää molekyylin 3-hydroksibutyryyli-KoA:ksi. Juuri reduktaasientsyymi tarvitsee NADPH:a toimintaansa. Lopuksi PHA-syntaasi polymerisoi 3-hydroksibutyraatin PHB:ksi ja toinen asetyyli-KoA vapautuu. (Khosravi-Darani ym. 2013, 1410.)



KUVIO 2. Kaaviokuva metanotrofisolujen aineenvaihduntareitistä, jossa syntyy poly-β-hydroksibutyraattia asetyyli-KoA:sta (Khosravi-Darani ym. 2013, 1414; Sudesh & Abe 2010, 6, muokattu)

Bakteerien substraatin saatavuus on yksi tärkeimmistä PHB:n saantoon vaikuttavista tekijöistä. Tuotannossa on aiemmin suosittu substraattina glukoosia, mutta halvempia vaihtoehtoja tutkitaan jatkuvasti. Hiilenlähteinä on käytetty jo muun muassa erilaisia leseitä ja ruokajätettä. Edullisempia vaihtoehtoja ovat myös esimerkiksi metanoli, hiilidioksidi ja metaani, joiden käyttö on monella tapaa edullista. (Khosravi-Darani ym. 2013, 1407, 1410; Zúñiga ym. 2011, 877.) Kun substraattina käytetään metaania, saantoa voidaan teoreettisesti ennakoida. Arviointi tehdään hapetetun metaanin perusteella stoikiometrisesti. Bakteerit käyttävät kuitenkin ison osan metaanista hiilidioksidin muodostamiseen, jotta ne saavat nikotiiniamidiadeniinifosfaattia ( $\text{NADP}^+$ ) PHB:n tuotannossa tarvittun reduktasientsyymien käyttöön. Käytännössä bakteerien hapettaman metaanin määrä ei siis suoraan kerro syntyvästä PHB:n määrästä. (Khosravi-Darani ym. 2013, 1407–1415.)

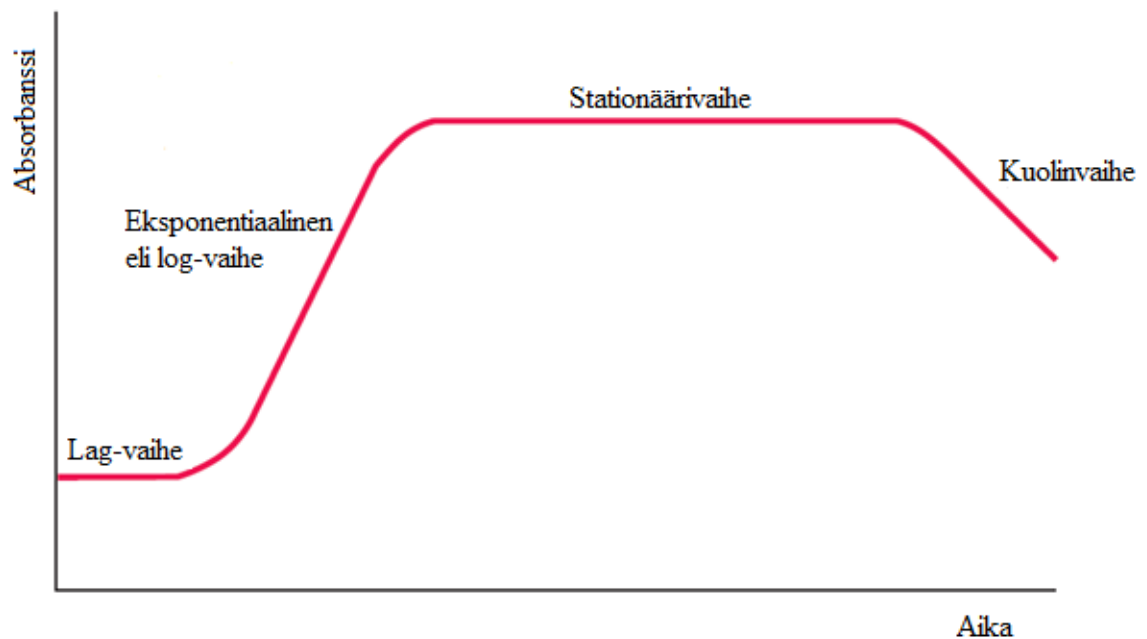
Substraattien lisäksi PHB:n tuotannossa metanotrofien avulla tutkitaan muun muassa syntyvän polymeerin molekyylipainoa (Wendlandt ym. 2001, 127; Zhang ym. 2008, 103), eri lajien potentiaalia polymeerin tuottamisessa (Pieja, Rostkowski & Criddle 2011, 564; Zúñiga ym. 2011, 876) ja kasvatusliuosten koostumuksen vaikutusta sekä PHB:n saantoon että polymeerin molekyylipainoon (Asenjo ym. 1995, 497; Pieja ym. 2011, 569; Wendlandt ym. 2001, 127). Pieja ym. (2011, 566) tutkivat eri typpi-, kupari- ja nitraattipitoisuuksien vaikutusta PHB:n saantoon metanotrofisekaviljelmän avulla. Tutkimuksessa todettiin, että nitraattittomalla kasvatusliuoksella typpeä sisältävässä kaasufaasissa saadaan eniten PHB:a (44 % biomassan kuivapainosta). Kuparin vaikutusta ei kyseisissä kokeissa pystytty varmistamaan. Myös Wendlandt ym. (2001, 128) käyttivät tutkimuksessaan sekaviljelmää. He tuottivat PHB:a reaktoreissa, joihin ei syötetty ammoniumia, fosforia tai magnesiumia. Tässä tutkimuksessa suurin PHB-saanto oli fosforittomassa kasvatuksessa. Helm ym. (2008, 1055) analysoivat metanotrofisekaviljelmällä rikin, kaliumin ja raudan vaikutusta PHB:n saantoon. Näistä suurin saanto saatiin kaliumittomassa kasvatusalustassa.

### **3 POLY- $\beta$ -HYDROKSIBUTYRAATIN TUOTTAMINEN SULJETUSSA SYSTEEMISSÄ METANOTROFIEN AVULLA**

#### **3.1 Bakteerien pullokasvatus ja kasvun määrittäminen**

Kun mikro-organismeja kasvatetaan nestemäisessä mediumissa, inkubointi suoritetaan yleensä suljetussa pullossa. Tällaista kasvatusta kutsutaan suljetuksi pullokasvatukseksi. Suljettuun systeemiin ei tehdä lisäyksiä eikä sieltä poisteta mitään lukuun ottamatta kaasufaasiin tehtäviä muutoksia. Solut kasvavat ja jakaantuvat pullossa, jolloin ravinteiden pitoisuus laskee ja vastaavasti jätteiden osuus kasvaa. Tästä syystä ne elävät vain rajoitetun ajan. Populaation kasvusta voidaan laatia kasvukäyrä, jossa erotetaan neljä eri vaihetta. (Hashsham & Baushke 2007, 302; Willey, Sherwood & Woolverton 2009, 130.)

Kasvukäyrän vaiheet ovat lag-vaihe, eksponentiaalinen eli log-vaihe, stationäärivaihe ja viimeisenä kuolinvaihe (kuvio 3, Willey ym. 2009, 130). Kun solut siirretään uuteen mediumiin, ne eivät ala heti jakautua. Tätä vaihetta kutsutaan lag-vaiheeksi. Bakteerit syntetisoivat muun muassa uusia entsyymejä ja ribosomeja tuoreiden ravinteiden hyödyntämiseksi. Eksponentiaalisen kasvun vaihe alkaa, kun solut ovat kahdentaneet DNA:nsa ja ryhtyvät jakautumaan. Eksponentiaalisessa kasvunvaiheessa mikro-organismit jakautuvat niin nopeasti kuin se on mahdollista ja kasvunopeus on vakio. Tällöin populaatio on yhdenmukaisin kemiallisilta ja fysiologisilta ominaisuuksiltaan. Tästä syystä bakteereja käytetään biokemiallisissa ja fysiologisissa tutkimuksissa juuri eksponentiaalisessa kasvunvaiheessa. Suljetussa pullokasvatuksessa log-vaihetta seuraa stationäärivaihe, jolloin elävien solujen määrä pysyy vakiona ja kasvukäyrä muuttuu horisontaaliseksi. Viimeinen kasvukäyrän osuus on niin sanottu kuolinvaihe, jolloin solut joko kuolevat tai eivät muusta syystä enää kasva ja jakaudu. (Hashsham & Baushke 2007, 302; Willey ym. 2009, 130–131.)



KUVIO 3. Mikrobien kasvukäyrässä erotetaan neljä vaihetta (Willey ym. 2009, 130, muokattu)

Bakteerien kasvukäyrä voidaan määrittää spektrofotometrisesti. Kun soluihin kohdistuu valoa, ne aiheuttavat sen sirontaa. Koska solut ovat suunnilleen samankokoisia, valonsironta on suoraan verrannollista biomassan määrään. Miljardi solua ( $10^9$ ) millilitrassa aiheuttaa bakteerisuspension lievää samenemista, jolloin valoa pääsee vähemmän läpi. Liuoksen läpäisevän valon määrä voidaan mitata spektrofotometrillä, jolloin saadaan liuoksen absorbanssi eli optinen tiheys. Kasvukäyrä esitetään kuvaajana, johon sijoitetaan bakteerisuspension absorbanssi ajan funktiona (kuvio 3, Willey ym. 2009, 130). (Willey ym. 2009, 136.) Lag-vaiheessa kasvatusliuos alkaa samentua. Bakteerien jakaantuessa log-vaiheessa liuos samenee nopeammin ja absorbanssi kasvaa. Lopulta bakteerien kasvu saavuttaa stationäärivaiheen ja absorbanssi tasaantuu. (Hashsham & Baushke 2007, 303.)

Kasvukäyrä kuvaa bakteeripopulaation kasvunvaiheet, mutta tarkemmin populaation kasvua voidaan seurata solumassan avulla. Suorin tapa tutkia populaation kasvua on määrittää biomassan kuivapaino. Bakteerisuspensio sentrifugoidaan, kerätyt solut kuivataan uunissa ja lopuksi punnitaan. Menetelmä on aikaa vievä eikä erityisen tarkka. Etenkin bakteereilla populaation kasvun määrittäminen kuivapainon avulla on melko epäluotettava ja hidas menetelmä, sillä bakteerisolut painavat hyvin vähän ja mediumia voi joutua sentrifugoimaan useita satoja millilitroja. (Willey ym. 2009, 135.) Nopeampi ja herkempi tapa on määrittää solujen massa spektrofotometrisesti. Absorbanssi on käy-

tännössä suoraan verrannollinen suspension solukonsentraatioon ja biomassan kuivapainokonsentraatioon alle 0,5 arvoilla. (Koch 1981, 194–195; Willey ym. 2009, 136.) Optisen tiheyden mittaaminen on tutkimuksissa paljon käytetty menetelmä mediumin biomassan konsentraation arvioimiseen. Biomassan pitoisuutta sillä ovat arvioineet muun muassa Wendlandt ym. (2001, 128) tuottaessaan PHB:a metanotrofien avulla.

On todettu, että riippumatta esimerkiksi bakteerisolun muodosta, absorbanssi on suunnilleen sama suhteessa kuivapainoon kaikilla lajeilla. Tästä huolimatta biomassaa mitattaessa UV-Vis-spektrofotometri kannattaa aina kalibroida tietyllä populaatiolla. Kalibrointia varten tarvitaan konsentroidu liuos bakteerikasvatusta, josta tehdään laimennos-sarja. On tärkeää tehdä sarja ripeästi, jotta liuoksissa ei ehdi tapahtua muutoksia kasvun suhteen. Absorbanssien mittausten jälkeen tulee määrittää biomassan konsentraatio tai solujen lukumäärä. Se voidaan tehdä esimerkiksi määrittämällä liuosten kuivapaino tai laskemalla solujen todennäköisin määrä. Tuloksista piirretään standardisuora, jossa esitetään absorbanssi konsentraation funktiona. (Koch 1981, 194–196.)

UV-Vis-spektrofotometrin aallonpituus valitaan tapauskohtaisesti. Laiteella mitattu sa-meus on voimakkaampaa matalammilla aallonpituuksilla, joten laimeita suspensioita mitattaessa kannattaa käyttää niitä. Toisaalta lyhyillä aallonpituuksilla bakteerien toimin-nan aiheuttamat kemialliset muutokset kasvatusliuoksessa saattavat vaikuttaa absor-banssiin. Tämä voidaan tarkistaa mittaamalla bakteerisuspension supernatantin absor-banssi ja vertaamalla sitä pelkän kasvatusliuoksen antamaan arvoon. (Koch 1981, 196–197.) Wendlandtin ym. (2001, 128) PHB:n tuottokokeissa käytettiin aallonpituutta 600 nanometriä ja sillä muodostettua optisen tiheyden standardisuoraa. Korkeampia aallon-pituuksia käytetään, kun pelkät kasvatusliuokset ovat kellertäviä tai ruskeita eli absor-boivat lähellä näkyvän valon spektrin sinistä osaa. Tällöin 660 nanometriä on suosittu aallonpituus, koska sillä nollanäytteen absorbanssi ei merkittävästi poikkea veden anta-masta arvosta. (Koch 1981, 196–197.)

### **3.2 Poly- $\beta$ -hydroksibutyraatin määrittäminen biomassasta**

Laboratoriomittakaavassa PHB:n konsentraatio määritetään tyypillisesti kylmäkuivatus-ta biomassasta kaasukromatografisesti liekki-ionisaatiotektoriolla (GC-FID) (Comeau, Hall & Oldham 1988, 2325; Oehmen ym. 2005, 132). Kylmäkuivauksessa eli lyofilisaa-



tiossa poistetaan materiaalista kaikki vesi siten, että yhdisteen rakenne ja koostumus eivät muutu. Kuivausprosessissa näyte saatetaan painetta ja lämpötilaa alentamalla lähelle sen kolmoispistettä, jossa vesi muuttuu suoraan kiinteästä kaasumaiseksi. Kuivaus koostuu primäärisestä ja sekundäärisestä vaiheesta. Primäärisessä kuivauksessa vesi poistuu jäisestä näytteestä sulamatta eli sublimoituu. Kun jää on poistunut ja kuivausta jatketaan (sekundäärinen vaihe), poistuu myös kaikki adsorboitunut ja kiinteään aineeseen sitoutunut vesi. (Matejtschuk 2007, 59–60.)

Kylmäkuivatusta biomassasta PHB hydrolysoidaan monomeereikseen, jotka derivatisoidaan. Johdoksenmuodostusta varten näytteeseen sekoitetaan happamaksi tehtyä alkoholia, jolloin PHB hydrolysoituu ja derivatisoituu. Liuokseen lisätään orgaanista liuotinta, joka uuttaa syntyneet 3HB-monomeerien esterit biomassasta kuumennuksen aikana. Jäähdytymisen jälkeen uutoseokseen lisätään vettä faasien erottamiseksi. Metanoli ja epäpuhtaudet siirtyvät epäorgaaniseen faasiin ja esterit orgaaniseen faasiin. Orgaaninen faasi kerätään talteen ja kuivataan, jotta mahdolliset vesijäämät ja liuottimen sisältämä vesi poistuvat. Käsitellyn näytteen PHB-pitoisuus määritetään kaasukromatografisesti. (Oehmen ym. 2005, 132.)

Kaasukromatografilla (GC) aineiden erottuminen perustuu niiden affiniteettiin stationäärifaasiin ja höyrystettyjen yhdisteiden suhteellisiin höyrynpaineisiin. Liikkuvana faasina on inertti kaasu ja stationäärifaasina useimmiten neste. Yhdisteet erotetaan niiden retentioaikojen perusteella. Liekki-ionisaatiodetektorissa (FID) on vety-ilmaliekki, jossa muodostuu ioneja ja elektroneja orgaanisten yhdisteiden palaessa. Palamisessa muodostuneet varaukselliset hiukkaset synnyttävät sähkövirran detektorin sähkökentässä. Mitattavan sähkövirran suuruus on verrannollinen tutkittavan aineen konsentraatioon. (McNair & Miller 2009, 3, 115.)

PHB:n kvantitoinnissa käytetään 3-hydroksibutaanihappoa (3HB). 3HB:sta tehdään sopivat laimennokset standardisuoraa varten. Standardiliuokset käsitellään kuten näytteet, jolloin niistä muodostuu 3-hydroksibutaanihapon estereitä. Liuosten vasteet mitataan GC-FID:lla ja tuloksista laaditaan standardisuora. Standardisuorassa esitetään GC:lta saadut piikkien pinta-alat standardiliuosten konsentraatioiden funktiona. (Oehmen ym. 2005, 132.)

Tehdasmittakaavassa PHB:n ja muiden polyhydroksialkanaattien uutossa käytetyt haihtuvat liuottimet ovat kalliita ja ympäristölle vaarallisia. Tästä syystä teollisuudessa käytetään mieluummin menetelmää, jossa liuotetaan ylimääräinen biomassa ja erotetaan PHB-rakeet siitä sentrifugoimalla. Eristyksessä on käytetty natriumhypokloriittia. Menetelmä on helppo ja yksinkertainen, mutta natriumhypokloriitti on vahva hapetin ja aiheuttaa voimakasta polymeerin hajoamista. Tämä näkyy molekyylipainossa jopa 50 prosentin alenemisena verrattuna solunsisäiseen polymeeriin. Liuottamismenetelmässä on saatu natriumhypokloriittia parempia tuloksia erilaisilla hapoilla, emäksillä ja tensideillä kuten natriumlauryylisulfaatilla (SDS). (Sudesh & Abe 2010, 21.)

### 3.3 Metaanin jakautuminen kaasuihin ja nestefaasiin

Kun metanotrofeja kasvatetaan suljetussa systeemissä, kaasufaasiin lisätään metaania bakteerien hiilenlähteeksi. Kasvatuspulloon lisätty metaani liukenee osittain myös nestefaasiin, mutta vähemmän kuin esimerkiksi typpi tai vety (Willey ym. 2009, 610). Nestefaasiin liuenneen metaanin pitoisuus voidaan laskea pulloon lisätyn metaanin määrän perusteella (yhtälö 1). Liuenneen kaasun ainemäärä  $n_{aq}$  on kaasufaasin paineen  $p_g$ , Bunsen-vakion  $\alpha$  ja nesteen tilavuuden  $V_{aq}$  tulo jaettuna kaasuvakion  $R$  ja normaalilämpötilan  $T_0$  tulolla. Bunsen-vakio  $\alpha$  perustuu muun muassa liuoksen suolapitoisuuteen. (Breitbarth, Mills, Friedrichs & LaRoche 2004, 282–288.)

$$n_{aq} = \frac{p_g \cdot \alpha \cdot V_{aq}}{R \cdot T_0} \quad (1)$$

Kaasufaasin metaanipitoisuus voidaan määrittää kaasukromatografisesti lämmönjohtokykydetektorilla (GC-TCD). Lämmönjohtokykydetektori (TCD) on detektoreista vanhimpia, mutta edelleen paljon käytetty. Sillä voidaan määrittää myös epäorgaanisia analyytteja kuten hiilidioksidia ja vetyä. TCD:lla aineet erottuvat lämmönjohtokykynsä perusteella. Detektorissa on neljä volframista valmistettua filamenttia, joihin johdetaan tasavirtaa. Tällöin niiden kaikkien lämpötila nousee. Kahden filamentin läpi johdetaan kantajakaasua. Tutkittava aine viedään kahteen muuhun, jolloin niiden lämpötila muuttuu, mikä puolestaan aiheuttaa resistanssin muutoksen. Tällöin syntyy jännite, joka mitataan. Sen suuruus on suoraan verrannollinen analyytin pitoisuuteen. (McNair & Miller 2009, 119–120.)

## 4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 4.1 Metanotrofipopulaation eristys

Tässä tutkimuksessa käytetty metanotrofipopulaatio eristettiin Tampereen teknillisen yliopiston Kemian ja biotekniikan laitoksella käytössä olleesta bioreaktorista. Bioreaktorin maa-aines oli kerätty kesällä 2013 Tarastenjärven kaatopaikan pintakerroksesta alueelta, joka on suljettu ja maisemoitu 1990-luvulla. Kaatopaikkamaahan oli sekoitettu viidesosa kompostimultaa Nokian Koukkujärveltä. Reaktoria oli aiemmin käytetty kaatopaikkamaan pintakerroksen toiminnan jäljittelemisessä ja tutkittaessa metanotrofien metaaninhapetusta erilaisissa olosuhteissa, mutta se on ollut pois käytöstä vuoden 2015 alusta. (Maanoja 2015.) Ennen eristystä bioreaktoriin syötettiin metaania kaatopaikkamaan metanotrofien aktivoimiseksi. Reaktorin metaaninkulutusta seurattiin, jolloin pystyttiin toteamaan metanotrofipopulaation aktiivisuus.

Metanotrofipopulaation eristys bioreaktorin kaatopaikkamaasta aloitettiin kaivamalla maata reaktorista noin 10 senttimetrin syvyydeltä. Kosteaa maata punnittiin noin 10 grammaa 300 millilitraan ravinteikasta NMS-mediumia (*nitrate mineral salts* - medium) (liite 1, NCIMB 2015, 13). Kasvatuspulloon injektoidiin 10-prosenttinen metaanikaasufaasi (v/v) ja inkubointi suoritettiin huoneenlämmössä 100 RPM (*revolutions per minute*, kierrosta minuutissa) ravistelussa. Seuraavana päivänä bakteerisuspensiota siirrostettiin uuteen NMS-mediumipulloon, johon lisättiin jälleen metaania 10-prosenttisen kaasufaasin aikaansaamiseksi. Sekä rikastuksessa että myöhemmissä kokeissa käytetty metaani oli AGA Oy:n 99,5-prosenttista metaanikaasua. Rikastusta jatkettiin useissa kasvatuspulloissa, kunnes suspensioissa ei havaittu enää maapartikkeleita.

### 4.2 Metanotrofien kasvukäyrä ja optisen tiheyden standardisuora

Kaatopaikkamaasta rikastettujen metanotrofien kasvukäyrän ja optisen tiheyden standardisuoran mittauksissa käytettiin Shimadzun UV-1700 PharmaSpec spektrofotometriä 600 nanometrin aallonpituudella. Bakteerit suspensoitiin tuoreeseen NMS-mediumiin ja liuoksen absorbanssi mitattiin tasaisin väliajoin. Jokaisella ajanhetkellä absorbanssi mitattiin kolmesti (liite 2, taulukko 10). Tuloksista laadittiin kuvaaja, jossa esitettiin ab-

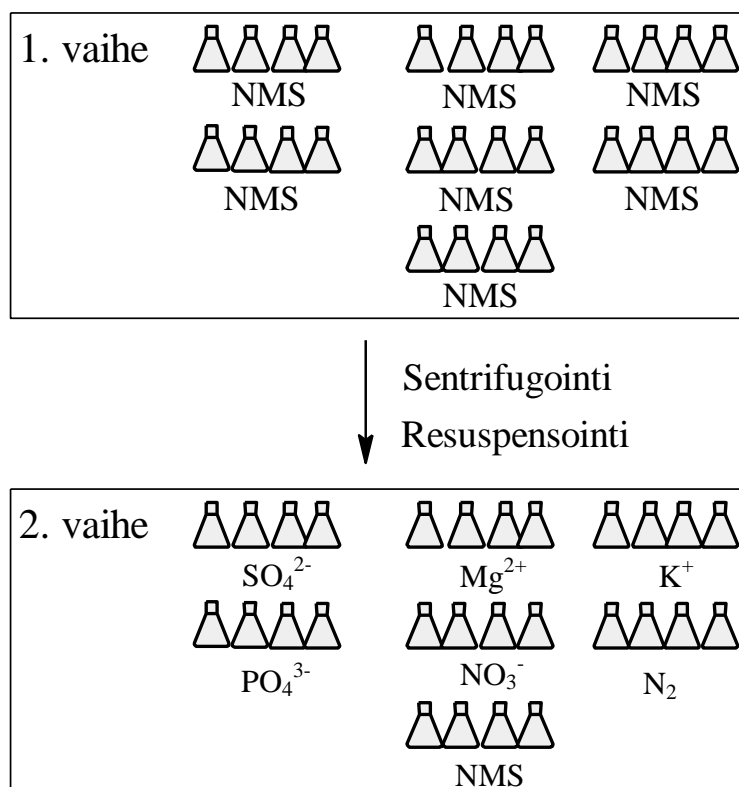
sorbanssi ajan funktiona. Tällöin saatiin populaation kasvukäyrä, jonka avulla varmistettiin, että PHB:n tuottokokeissa oli käytössä eksponentiaalisen kasvunvaiheen bakteereja.

Optisen tiheyden standardisuoran avulla oli tarkoitus seurata PHB:n tuottokokeiden kasvatuspullojen biomassan konsentraatiota. Standardisuoraa varten konsentroidiin bakteerisuspensio, jonka absorbanssi oli yli 1,0. Tästä liuoksesta tehtiin neljä erilaista laimennosta 10 %, 25 %, 50 % ja 75 %; jokaisesta kaksi rinnakkaista. Liuoksia pidettiin mittausten ajan jäällä, jotta absorbanssit saatiin mitattua samalla ajanhetkellä eli samassa kasvunvaiheessa. Jokaisesta standardista mitattiin absorbanssi kahdesti (liite 3, taulukko 11). Mittauksen jälkeen määritettiin suspensioiden kuiva-ainepitoisuus sentrifugoiduista kasvatusliuoksista. Kuiva-ainemääritys tehtiin standardin SFS-EN 14346 (2007, 10–12) mukaan vakiopainotetuissa upokkaissa haihduttamalla bakteerisuspensiota yön yli 105 celsiusasteessa. Tuloksista laadittiin standardisuora, jossa esitettiin absorbanssi laimennosten kuiva-ainepitoisuuksien funktiona.

#### 4.3 Poly- $\beta$ -hydroksibutyraatin tuottokokeet ja biomassan keräys

Tämän tutkimuksen tarkoitus oli vertailla metanotrofien kykyä tuottaa PHB:a, kun mediumista poistettiin sulfaatti  $\text{SO}_4^{2-}$ , magnesium  $\text{Mg}^{2+}$ , kalium  $\text{K}^+$ , fosfaatti  $\text{PO}_4^{3-}$  tai nitraatti  $\text{NO}_3^-$ . Lisäksi tutkittiin ilman typen  $\text{N}_2$  rajoittamista nitraatittomassa mediumissa, sillä tyypin II metanotrofit kykenevät käyttämään myös sitä ravinteenaan. Kaikki kokeissa käytetyt lasiastiat pestiin 10-prosenttisella suolahapolla.

PHB:n tuotto suoritettiin kahdessa vaiheessa suljetuina kasvatuksina seerumipulloissa (kuvio 4). Kokeita varten valmistettiin 7 sarjaa: yksi sarja kutakin ravinteetonta kasvatusmediumia varten, yksi sarja  $\text{N}_2$ -rajoitettua kasvatusta varten sekä yksi sarja NMS eli *nitrate mineral salts* –mediumissa kasvatusta varten. Kasvattamalla bakteereja myös ravinteikkaassa mediumissa voitiin vertailla populaation metaaninhapetusta ja syntyvän biomassan määrää ravinteettomiin kasvatuksiin. Jokaiseen sarjaan otettiin neljä rinnakkaista kasvatuspulloa. Ensimmäisessä vaiheessa bakteerisuspensiota siirrostettiin NMS-mediumiin 28 pulloon, jotka suljettiin tiiviisti. Kasvatuksissa käytetyt neste- ja kaasufaasin tilavuudet on esitetty taulukossa (1). Nestefaasin  $V_{\text{aq}}$  muodostivat bakteerisuspensio (5 millilitraa) ja medium (35 millilitraa).



KUVIO 4. Kaaviokuva PHB:n tuottokokeissa käytetyistä kasvatussarjoista (NMS eli kasvatus ravinteikkaassa *nitrate mineral salts* –mediumissa, ravinteettomat kasvatussarjat nimetty poistetun ravinteen mukaan)

TAULUKKO 1. Kasvatuksissa käytettyjen neste- ja kaasufaasien tilavuudet

	V	
	ml	V-%
Seerumipullo	120	100
Nestefaasi	40	33
Kaasufaasi	80	66

Kasvatuspulloihin injektointiin 10-prosenttinen kaasufaasi metaanin suhteen.  $\text{N}_2$ -rajoitettujen kasvatusten kaasufaasia huuhdeltiin ensin heliumilla ilman typen määrän vähentämiseksi, minkä jälkeen niihin lisättiin happea 17 millilitraa ja metaania kuten muihinkin pulloihin. Tällä tavoin pyrittiin jäljittelemään muiden pullojen kaasukoostumusta muuten kuin typen osalta. Kasvatuspullojen kaasufaasien koostumukset on koottu taulukkoon (2). Bakteerisuspensioiden absorbanssit mitattiin heti sulkemisen jälkeen ja uudelleen kolmen tunnin päästä, millä varmistettiin bakteerien eksponentiaalisen kasvun vaiheen käynnistyminen. Pulloja inkuboititi huoneenlämmössä 100 RPM ravistelussa.

TAULUKKO 2. Kasvatuspullojen kaasufaasit: tähdellä merkityt arvot on tarkistettu kaasukromatografisesti ja niistä on ilmoitettu sarjojen pullojen vaihteluväli, muut arvot laskennallisia

	N <sub>2</sub> -%	CH <sub>4</sub> -%	O <sub>2</sub> -%
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	74	9-11*	16
Mg <sup>2+</sup>	74	9-11*	16
K <sup>+</sup>	74	9-11*	16
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	74	9-11*	16
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	74	9-11*	16
N <sub>2</sub>	15-18*	9-11*	21
NMS	74	9-11*	16

Toista vaihetta eli varsinaisia PHB:n tuottokokeita varten valmistettiin kasvatusliuoksia NMS-mediumin ohjeen mukaan (liite 1, NCIMB 2015, 13), mutta tutkittava ravinne poistettiin tai korvattiin mahdollisimman samankaltaisella yhdisteellä. Suolojen korvaaminen tehtiin siten, että mediumiin jäävän ionin ainemäärää ei muutettu. Taulukossa (3) on esitetty alkuperäiset ravinneyhdisteet sekä suolat, joilla ne korvattiin. Kaikissa mediuumeissa käytettiin samaa hivenaineliuosta (liite 1, NCIMB 2015, 13, liuos 4), vaikka se sisältää sulfaatteja. Sulfaattien määrä on hivenaineliuoksessa hyvin pieni ja sen korvaaminen koettiin tarpeettoman hankalaksi. Sen poistaminen taas olisi aiheuttanut bakteereille elintärkeiden hivenaineiden kuten kuparin ja sinkin puuttumisen. Fosfaattien korvaamista toisella puskurilla pohdittiin. Esimerkiksi karbonaattien lisääminen katsottiin kuitenkin turhan suureksi muutokseksi mediumissa, joten fosfaatit vain poistettiin.

TAULUKKO 3. Ravinteettomien mediumien valmistuksessa käytetyt yhdisteet

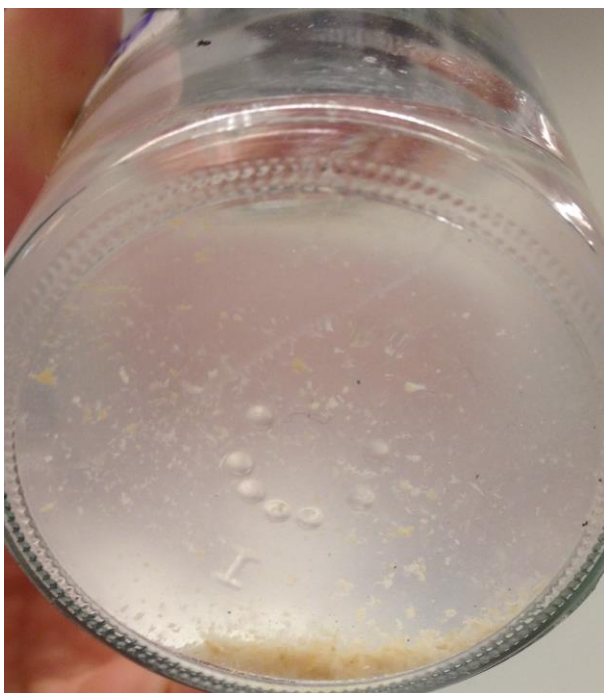
NMS-medium			Ravinteeton medium	
Sarja	suola(t)	massa g	suola(t)	massa g
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	MgSO <sub>4</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	10,0	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	8,9
Mg <sup>2+</sup>	MgSO <sub>4</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	10,0	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,2
K <sup>+</sup>	KNO <sub>3</sub>	10,0	NaNO <sub>3</sub>	8,4
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	26,0	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	26,4
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	71,6	-	-
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	26,0	-	-
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	KNO <sub>3</sub>	10,0	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8,6
N <sub>2</sub>	KNO <sub>3</sub>	10,0	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8,6

Kasvatusliuosten sähkönjohtokyky ja pH mitattiin ennen bakteerisuspension lisäystä ja uudelleen PHB:n tuoton ja biomassan keräyksen jälkeen (liite 4, taulukko 12). Alku- ja loppuarvoista laskettiin erotukset. Tällöin pystyttiin vertaamaan liuosten ionikonsentraatioita ja niiden muutoksia. Erityisesti fosfaatittoman mediumin pH:n muutosta haluttiin seurata, sillä siitä puuttui kokonaan puskuri.

Metanotrofipopulaation eksponentiaalisen kasvunvaiheen käynnistyttyä tuottokokeiden ensimmäisen vaiheen inkubointi päätettiin. Bakteerisuspensiot sentrifugoitiin nopeudella 5 200 RCF (sentrifugaalivoima) 15 minuuttia. Supernatantit hävitettiin. Toisen vaiheen kasvatuksia varten kaikki bakteerinapit pestiin ja resuspensoitiin ravinteettomiin mediuimeihin jälleen 40 millilitraksi (kuvio 4). Suspensiot siirrettiin steriileihin seerumipulloihin. Suljettuihin pulloihin tehtiin kaasufaasien muutokset kuten ensimmäisessä vaiheessa.

Toisessa vaiheessa lisätyn metaanin määrä varmistettiin Shimadzun GC-2014 GC-laitteistolla, jossa oli detektorina lämmönjohtokykydetektori (TCD). Laitteistossa käytettiin pakattua kolonnia (1,8 metriä pitkä Agilentin Porapak N 80–100 Mesh, sisähalkaisija on 2,00 millimetriä). Kolonniuunin lämpötilaohjelma oli isoterminen 40 celsiusasteessa. Injektorin ja detektorin lämpötila pidettiin 80 celsiusasteessa ja TCD:n sähkövirta 50 milliampeerissa. Kantajakaasuna käytettiin heliumia, jonka nopeus oli 25 millilitraa minuutissa. Jokaisesta kasvatuspullosta injektointiin kerran 200 mikrolitraa.

Seuraavana päivänä kaasufaasien metaanipitoisuus mitattiin jälleen ja ilmastuksen jälkeen metaaninlisäys toistettiin. Nitraatittomissa kasvatuksissa metaaninhapetus oli selvästi muita heikompaa, joten niiden metaaninlisäys ja typpirajoitetun kaasufaasin huuhdeltu tehtiin myöhemmin samana päivänä. Kaikkia sarjoja inkuboitiin jälleen yön yli ja seuraavana päivänä tehtiin uudet metaanilisäykset muihin kuin nitraatittomiin kasvatuspulloihin. Kahden vuorokauden inkuboinnin jälkeen kasvatuspulloissa havaittiin metanotrofeille ominainen vaalean oranssi väri (kuva 2).



KUVA 2. Kaatopaikkamaasta rikastettu bakteerisuspensio NMS-mediumissa kahden vuorokauden 10-prosenttisessa metaanikaasufaasissa inkuboinnin jälkeen

Inkuboinnin päätyttyä laskettiin pulloissa kuluneen metaanin määrä koko inkuboinnin aikana. Kaasufaasin metaanipitoisuus määritettiin GC-TCD:lla mitatun standardikaasun avulla. Nestefaasiin liuenneen metaanin määrä laskettiin yhtälön (1) avulla. Yhtälön (1) Bunsen-vakiolle  $\alpha$  käytettiin arvoa 0,0323 ja kaasufaasin paineelle  $p_g$  arvoa 1001,7 hehtopascalia.

Kasvatusliuosten biomassakonsentraatio pyrittiin määrittämään optisen tiheyden avulla, mutta kasvatusliuosten absorbanssien perusteella biomassan määrän epäiltiin olevan siihen liian suuri. Varmistuksena tehtiin standardin SFS-EN 14346 (2007) mukaan jokaisen sarjan yhdestä rinnakkaisesta pullosta kuivapainomääritys, joka todensi asian. Määrityksessä kaikkien sarjojen biomassan kuivapainoksi saatiin vähintään 100 milligrammaa 40 millilitrassa eli 2 500 milligrammaa litrassa. Arvot olivat huomattavasti suurempia kuin optisen tiheyden standardisuoran korkein pitoisuus. Tästä syystä biomassan PHB-pitoisuudet normalisoitiin kylmäkuivatun massan suhteen optisen tiheyden avulla määritetyn massan sijaan.

Jokaisen sarjan kolme jäljellä olevaa rinnakkaista pulloa sentrifugoitiin (5 200 RCF, 15 minuuttia). Supernatantti hylättiin pH:n ja sähkönjohtokyvyn mittauksen jälkeen. Biomassanäytteet pakastettiin ja kylmäkuivattiin seuraavana päivänä Christ'n Alpha 1–4



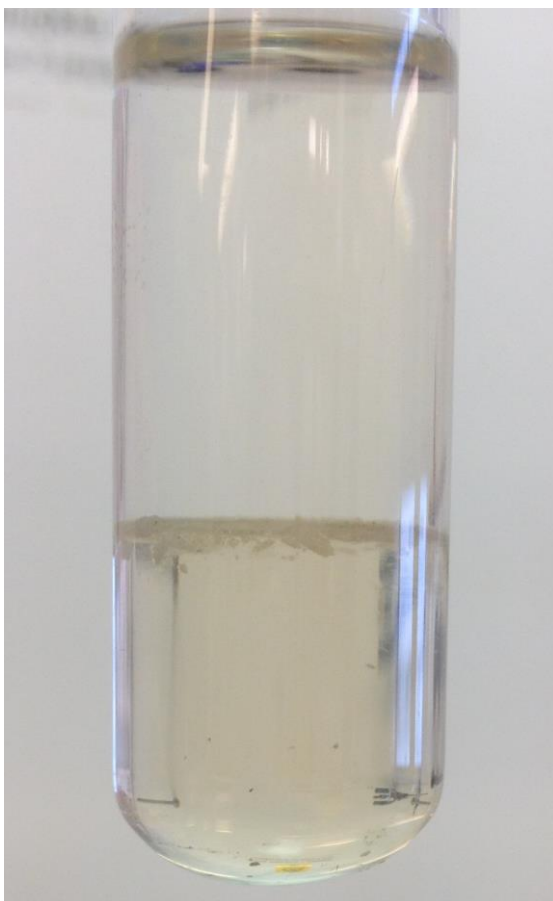
LD Plus laitteistolla 0,37 millibaarin paineessa. Kuivatut näytteet punnittiin uuttoon var-  
ten kuumennusta kestäviin putkiin (HACH).

#### 4.4 Poly- $\beta$ -hydroksibutyraatin uutto ja analysointi

PHB:n uutto ja analysointi tehtiin Oehmen ym. (2005, 132) optimoiman menetelmän mukaan. Näytteisiin lisättiin taulukon (4) mukaisesti reagenssit. Rikkihapolla happamaksi tehtyä metanolia käytettiin PHB:n hydrolysointiin ja syntyneiden monomeerien metylointiin. Muodostunut johdos oli siis 3-hydroksibutyraatin metyyliesteri. Kloroformilla uutettiin monomeerien metyyliesterit biomassasta. Näytteitä kuumennettiin 100 celsiusasteessa kaksi tuntia, minkä jälkeen niihin lisättiin ultrapuhdasta vettä. Tällöin orgaaninen ja epäorgaaninen faasi erottuivat (kuva 3). Alafaasi, joka sisälsi esteröidyt 3HB-monomeerit, siirrettiin uuteen HACH-putkeen kaksoispipetointitekniikalla. Kerätty näyte kuivattiin natriumsulfaatilla. Kuivauksen jälkeen näytteet siirrettiin GC-näytepulloihin.

TAULUKKO 4. Kylmäkuivattujen biomassanäytteiden käsittely

Reagenssi	Tarkoitus	V ml
3 % $\text{H}_2\text{SO}_4$ : MeOH (v/v)	Polymeerin hydrolysointi Monomeerien metylointi	2
99+ % $\text{CHCl}_3$	Monomeeriestereiden uutto	2
$\text{H}_2\text{O}$	Faasien erottaminen	1



KUVA 3. Faasisien erottuminen näytteenkäsittelyssä

Standardisuora laadittiin Oehmen ym. (2005, 132) mukaan 3HB:lla. Standardeja varten valmistettiin kiinteästä 98-prosenttisesta 3-hydroksibutaanihakosta (Alfa Aesar) perusliuos, jonka pitoisuus oli 29 565 milligrammaa litrassa. Standardit valmistettiin perusliuoksesta taulukon (5) mukaisesti ja käsiteltiin kuten näytteet. Lisäksi valmistettiin nollanäyte, johon ei lisätty lainkaan 3HB:a. Kaikki analyyseissa käytetyt lasi- ja muoviasi-at pestiin etukäteen 10-prosenttisellä suolahapolla.

TAULUKKO 5. 3HB standardien valmistus

Standardi	$V_{3HB}$ μl	$C_{3HB}$ mg/l
1	1	14,8
2	4	59,1
3	10	147,8
4	25	369,6
5	50	739,1
6	75	1108,7
7	100	1478,3

Sekä näytteiden että standardien mittaukset tehtiin ThermoFinniganin Focus GC-FID:lla. Mittauksissa käytettiin J&W Scientificin DB-5-kapillarikolonnia (pituus 25 metriä, sisähalkaisija 0,200 millimetriä, stationäärifaasina 95 % metyyliipolysiloksaania ja 5 % fenyyliipolysiloksaania 0,33 mikrometriä). Kantajakaasu heliumin virtaus säädettiin 1,5 millilitraan minuutissa. Jakoinjektion suhde oli 1 : 15 ja injektioilavuus kolme mikrolitraa. Jokaisesta näytteestä ja standardista otettiin kolme rinnakkaista injektiota. Ruisku pestiin näytekäsittelyn liuottimella eli kloroformilla. Lämpötilaohjelma oli aiemmin optimoitu tälle laitteelle Tampereen teknillisellä yliopistolla mukaillen Oehmen ym. (2005, 132) menetelmää (taulukko 6).

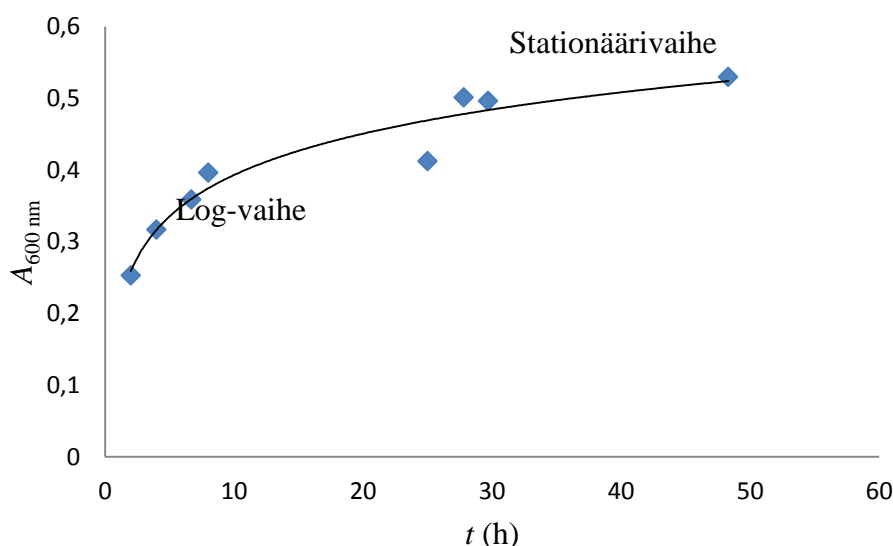
TAULUKKO 6. GC-FID-mittauksissa käytetty kolonniuunin lämpötilaohjelma

Nopeus °C/min	Lämpötila °C	Pito min
	80	1
10	120	0
80	270	3

## 5 TULOKSET

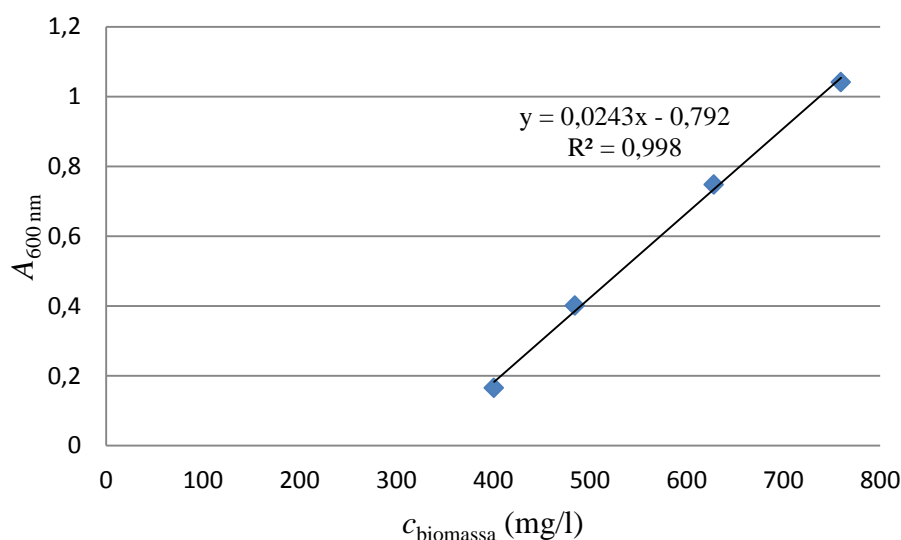
### 5.1 Metanotrofien kasvukäyrä ja optisen tiheyden standardisuora

Rikastetulle metanotrofipopulaatiolle määritettiin kasvukäyrä, jotta PHB:n tuotto voitiin tehdä eksponentiaalisen kasvunvaiheen bakteereilla. Kasvukäyrä määritettiin spektrofotometrisesti 600 nanometrin aallonpituudella. Bakteerisuspension absorbanssi mitattiin tasaisin väliajoin. Tulokset sijoitettiin kuvaajaan, jossa esitettiin absorbanssi ajan funktiona (kuvio 5). Näin saadusta kasvukäyrästä voidaan erottaa metanotrofipopulaation kasvun eksponentiaalinen eli log-vaihe ja stationäärivaihe.



KUVIO 5. Metanotrofipopulaation kasvukäyrä

Rikastetulla bakteerisuspensiolla määritettiin myös optisen tiheyden standardisuora PHB:n tuottokokeiden bakteerisuspensioiden biomassakonsentraation määrittämiseksi. Standardisuora tehtiin mittaamalla neljän erivahvuisen bakteerisuspension absorbanssi samalla ajanhetkellä. Suspensioiden kuiva-ainepitoisuus määritettiin standardin SFS-EN 14346 (2007) mukaan. Tuloksista laadittiin optisen tiheyden standardisuora (kuvio 6).



KUVIO 6. Optisen tiheyden standardisuora

Optisen tiheyden standardisuoraa oli tarkoitus käyttää PHB:n tuottokokeiden kasvatus-ten biomassakonsentraation määrittämiseen. Bakteerisuspensioiden epäiltiin kuitenkin olevan liian sameita, joten jokaisen sarjan yhdestä rinnakkaisesta pullosta tehtiin kuivapainomääritys standardin SFS-EN 14346 (2007) mukaan. Kuivapainomääritysten tulokset on koottu taulukkoon (7). Kaikkien näytteiden biomassapitoisuuksien todettiin ylitävän optisen tiheyden standardisuoran väkevimmän laimennoksen pitoisuuden.

TAULUKKO 7. Kuivapainomääritysten tulokset

Sarja	$m_{\text{biomassa}}$ mg	$V_{\text{bakteerisuspensio}}$ ml	$c_{\text{biomassa}}$ mg/l
$\text{SO}_4^{2-}$	110,1	40	2753
$\text{Mg}^{2+}$	108,6	40	2715
$\text{K}^+$	106,7	40	2668
$\text{PO}_4^{3-}$	102,6	40	2565
$\text{NO}_3^-$	104,6	40	2615
$\text{N}_2$	100,0	40	2500
NMS	100,7	40	2518

## 5.2 Ravinteettomien mediumien pH:t ja sähkönjohtokyvyt

PHB:n tuottokokeissa käytettyjen mediumien sähkönjohtokyky ja pH mitattiin ennen bakteerisuspension lisäämistä. Mittaus toistettiin PHB:n tuoton ja biomassan keräyksen

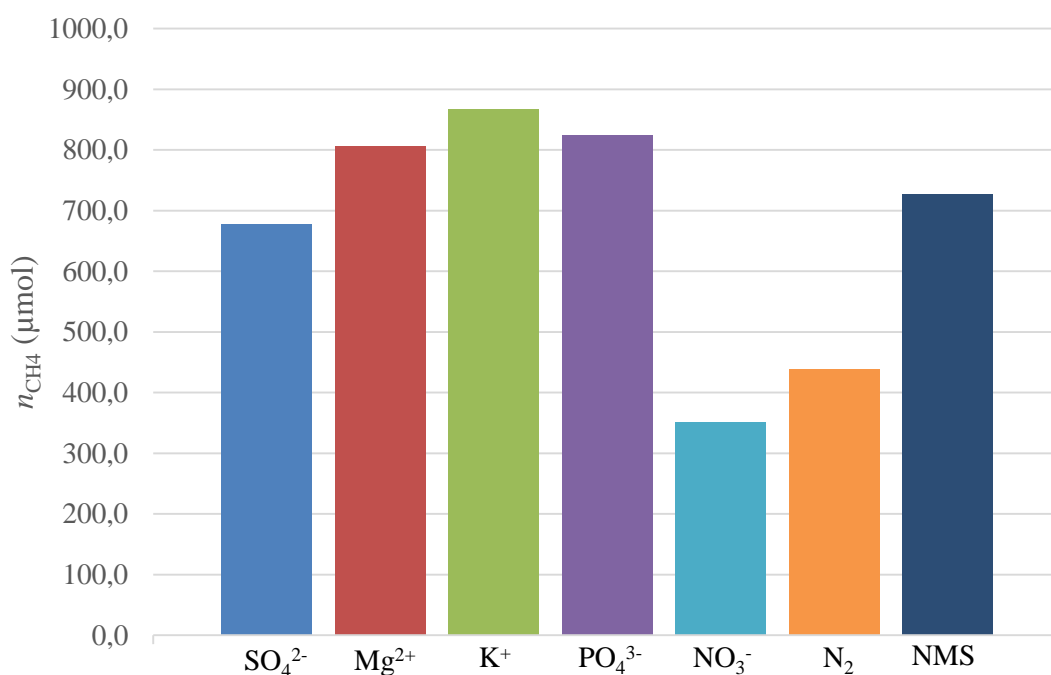
jälkeen. Kaikissa kasvatusliuoksissa pH ja sähkönjohtokyky laskivat hieman (taulukko 8). Sähkönjohtokyvyn ja pH:n muutokset olivat kaikissa kasvatussarjoissa suunnilleen yhtä suuria, paitsi NMS-mediumin pH:n muutos, joka oli selvästi muita pienempi.

TAULUKKO 8. Mediumien pH:n ja sähkönjohtavuuden muutokset

	pH	$\sigma$ mS/cm
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	-0,23	-0,60
Mg <sup>2+</sup>	-0,39	-0,72
K <sup>+</sup>	-0,31	-0,63
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	-0,23	-0,72
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-0,44	-0,61
N <sub>2</sub>	-0,45	-0,85
NMS	-0,08	-0,87

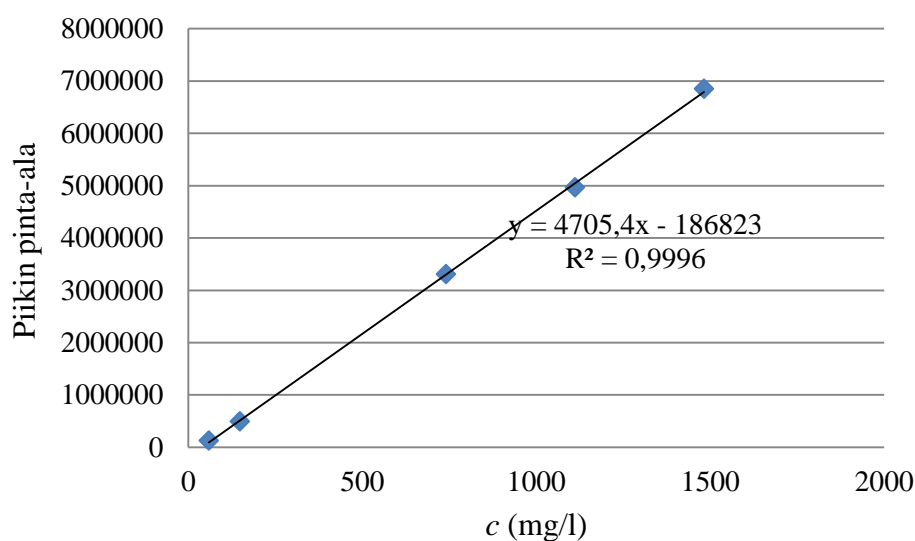
### 5.3 Metanotrofien metaaninhapetus ja poly- $\beta$ -hydroksibutyraatin tuotto

PHB:a tuotettiin 10-prosenttisessa metaanikaasufaasissa seitsemässä sarjassa, joista jokaisessa oli neljä rinnakkaista kasvatuspulloa. Viidessä sarjassa mediumista poistettiin yksi ravinteista SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> tai NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Kuudennessa sarjassa mediumista poistettiin NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, minkä lisäksi pullon kaasufaasin typpipitoisuutta rajoitettiin. Seitsemäs sarja kasvatettiin koko ajan NMS-mediumissa, jolloin bakteereilla oli kaikki ravinteet käytössään. Bakteerien hapettaman metaanin kokonaismäärä laskettiin GC-TCD:lla kaasufaasille saaduista tuloksista. Nestefaasin metaanin määrän laskemisessa käytettiin Breitbarthin ym. (2004, 282) laskukaavaa (yhtälö 1). Seitsemän sarjan neljälle pullolle laskettiin hapetetun metaanin kokonaismäärät (liite 5, taulukko 13). Kuviossa (7) on esitetty hapetetun metaanin määrien keskiarvot sarjoittain. Selvästi vähiten metaania hapettui sarjoissa NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ja N<sub>2</sub> eli nitraatittomissa kasvatuksissa. Muissa sarjoissa bakteerit hapettivat metaania jopa kaksinkertaisen määrän nitraatittomiin verrattuna.

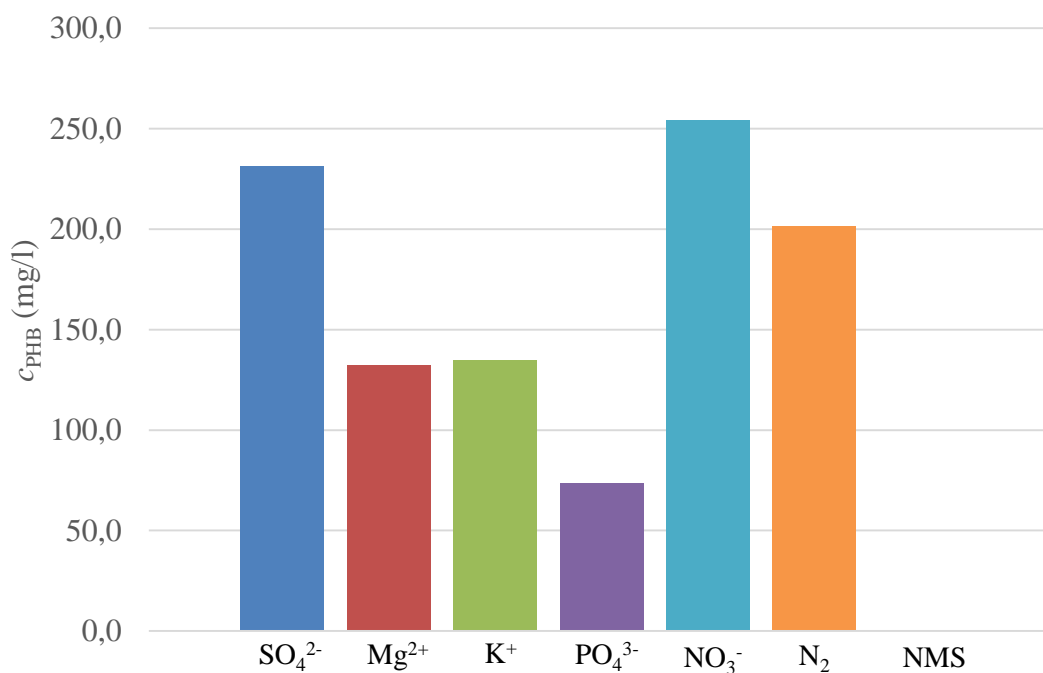


KUVIO 7. Metanotrofitien hapettaman metaanin ainemäärien keskiarvot sarjoittain toisen vaiheen ravinteettomissa kasvatuksissa

Inkuboinnin päätyttyä bakteerisuspensiot sentrifugoitiin ja kylmäkuivattiin. Kylmäkuivatusta biomassasta määritettiin sen PHB-konsentraatio GC-FID:lla. Konsentraatioiden määrittämistä varten laadittiin 3-hydroksibutyraatin metyyliesterin standardisuora (kuvio 8). Kylmäkuivatusta biomassasta uutetun PHB:n konsentraatiot on esitetty kuviossa (9) sarjojen keskiarvoina. Biomassasta uutetun PHB:n konsentraatiot kasvatuspulloittain on esitetty taulukossa (13) (liite 5, taulukko 13).



KUVIO 8. 3-hydroksibutyraatin standardisuora



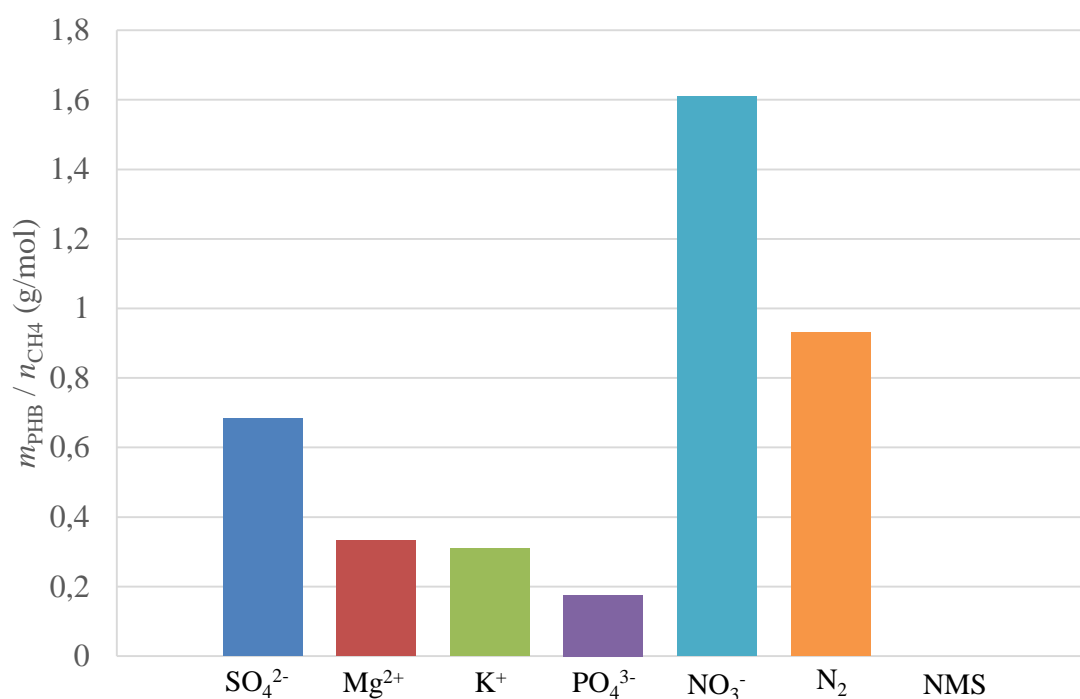
KUVIO 9. Metanotrofibiomassoista uutettujen PHB-konsentraatioiden keskiarvot sarjoittain

Jotta ravinteiden vaikutusta voitiin vertailla, suhteutettiin tuotetun PHB:n määrä biomassassa ja kasvatuspullossa hapettuneen metaanin määrä kerätyn biomassan määrään. Näistä arvoista laskettiin vielä keskiarvotulokset keskihajontoineen jokaiselle ravinteelle (taulukko 9). Kuviossa (10) on esitetty, kuinka monta grammaa yhdestä metaanimoolista saatiin PHB:a kullakin ravinteettomalla kasvatuksella keskimäärin. PHB:n saanto oli merkittävästi suurin nitraatittomissa kasvatusliuoksissa.



TAULUKKO 9. Kasvatuspulloista kerättyjen suspensioiden massa kylmäkuivauksen jälkeen, kylmäkuivatusta suspensiosta uutetun PHB:n massa suhteutettuna biomassan määrään ja bakteeripopulaation hapettaman metaanin ainemäärä suhteessa biomassan massaan koko inkuboinnin aikana; tuloksista laskettu keskiarvo ja keskihajonta kolmelle rinnakkaiselle kasvatukselle

	$m_{\text{biomassa}}$			$m_{\text{PHB}}/m_{\text{biomassa}}$			$n_{\text{CH}_4}/m_{\text{biomassa}}$		
	mg			µg/mg			µmol/mg		
$\text{SO}_4^{2-}$	14,8	±	2,4	32,1	±	6,4	46,9	±	10,9
$\text{Mg}^{2+}$	17,1	±	1,2	22,9	±	0,8	41,7	±	2,2
$\text{K}^+$	18,0	±	1,3	17,9	±	0,7	42,3	±	2,7
$\text{PO}_4^{3-}$	18,9	±	0,1	14,0	±	0,7	42,2	±	2,8
$\text{NO}_3^-$	18,6	±	0,6	14,7	±	0,4	44,0	±	4,9
$\text{N}_2$	18,2	±	0,4	14,8	±	3,5	45,2	±	5,3
NMS	17,3	±	0,9	15,6	±	3,8	50,6	±	4,2



KUVIO 10. Ravinteettomilla mediuimeilla tuotetun PHB:n määrien keskiarvot yhtä metaanimoolia kohden

## 6 POHDINTA

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää, miten eri ravinteet vaikuttavat eksponentiaalisessa kasvunvaiheessa olevien metanotrofien metaaninhapetukseen ja poly- $\beta$ -hydroksibutyraatin tuotantoon, kun substraattina on metaani. Kasvualustan ravinnekoostumuksen optimoinnin avulla voidaan tehostaa metanotrofien PHB:n tuotantoa. Opinnäytetyön tarkoituksena oli kasvattaa rikastettua metanotrofipopulaatiota eksponentiaalisessa kasvunvaiheeseen ja jatkaa kasvatusta mediuumeissa, joista on poistettu nitraatti, sulfaatti, fosfaatti, magnesium tai kalium. Lisäksi tehtiin toinen kasvatussarja nitraattitomassa mediumissa, jossa kasvatuspullojen kaasufaasin typen määrää rajoitettiin. Tällöin bakteerit tuottavat poly- $\beta$ -hydroksibutyraattia, jonka määrä mitataan inkuboinnin päätyttyä kylmäkuivatusta biomassasta kaasukromatografisesti. Kokeet tehtiin suljettuihin pullokasvatuksina.

Metanotrofipopulaatio rikastettiin kaatopaikka- ja kompostimaan sekoituksesta bioreaktorista, jossa bakteerit ehtivät olla ilman metaania useita kuukausia. Rikastus suoritettiin suljetuissa systeemeissä, jossa kaasufaasin vaihto ja metaanin lisäys tehtiin muutaman päivän välein. Välillä metaani todennäköisesti loppui ja bakteerit joutuivat epäsuotuisiin olosuhteisiin. Tästä syystä voisi olettaa, että rikastus suosi tyypin II metanotrofeja. Toisaalta matala metaanipitoisuus suosii tyypin I metanotrofeja. Tarkempaa tietoa populaation lajikoostumuksesta voitaisiin saada jatkotutkimuksissa esimerkiksi polymeraasiketjureaktiomenetelmällä (PCR-menetelmä), jolloin kasvuolosuhteita voitaisiin hienosäätää entisestään.

Eksponentiaalisen kasvunvaiheen varmistamiseksi määritettiin kaatopaikkamaasta rikastetun metanotrofipopulaation kasvukäyrä. Populaation kasvun lag-vaihetta ei havaittu todennäköisesti siksi, että bakteerit siirrettiin NMS-mediumista toiseen. Tällöin niiden ei tarvinnut syntetisoida entsyymejä erilaisten ravinteiden käyttämiseen. Muuten työssä saatu kasvukäyrä on Willeyn ym. (2009, 130) mallin mukainen. Siinä erotetaan metanotrofipopulaation log-vaihe ja stationäärivaihe. Optisen tiheyden standardisuoraa ei voitu käyttää PHB:n tuottokokeista saadun biomassan konsentraation määrittämiseen, sillä kokeiden bakteerisuspensiot olivat paljon odotettua väkevämpiä. Niiden absorbanssit olivat inkuboinnin päättyessä yli 1,0, kun absorbanssi on suoraan verrannollinen solukonsentraatioon ylimmillään 0,5 absorbanssiarvoilla. Standardisuoran laimennosten

pitoisuuksia ei siis olisi voinut enää kasvattaa. PHB:n tuottokokeita kannattaisi testata laimeammilla bakteerisuspensioilla, jolloin biomassan määrä voitaisiin laskea optisen tiheyden standardisuoran avulla. Se on menetelmänä huomattavasti nopeampi ja vaivat-  
tomampi kuin biomassan kuivapainon määrittäminen.

PHB:n tuottokokeissa metanotrofit syntetisoivat PHB:a kaikissa ravinteettomissa sarjoissa. NMS-mediumissa sitä ei syntynyt. Kasvatuspullojen kaasufaasin metaani ehti välillä kulua loppuun inkubointien aikana  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$  ja  $PO_4^{3-}$  -sarjojen kasvatuspulloissa. Biomassan PHB-varasto toimii bakteerien hiilen- ja energianlähteenä, kun ulkoista hiilenlähdettä ei ole saatavilla. On mahdollista, että bakteerit ottivat syntetisoimansa PHB:n uudelleen käyttöön. Näissä sarjoissa bakteerit saattoivat siis syntetisoida PHB:a enemmän kuin tulokset antavat ymmärtää. Kokeet kannattaisi uusina lyhyemmällä metaaninlisäysväleillä siten, että bakteerit eivät ehtisi hapettaa kaikkea metaania. Toinen vaihtoehto olisi käyttää laimeampaa bakteerisuspensiota, jolloin metaaninhapetus ei olisi yhtä tehokasta. Tässä työssä metanotrofipopulaatio oli odotettua tehokkaampi lisääntymään ja hapettamaan metaania.

Toisaalta Pieja, Sundstrom ja Criddle (2011, 6015) osoittivat, että bakteerit eivät ota PHB:a käyttöönsä heti ulkoisen hiilenlähteen loppuessa. Heidän tutkimuksessaan kasvatettiin tyypin II metanotrofia *Methylocystis parvusta* kahdessa vaiheessa. Ensin populaatiota kasvatettiin typettömässä mediumissa metaanikaasufaasissa. Kun metaani loppui, PHB:n määrä ei merkittävästi laskenut, jos typpeä ei edelleenkään ollut tarjolla. Solupopulaatio ei myöskään pienentynyt tänä aikana. Kun bakteereille annettiin jälleen sekä typpeä että metaania, ne alkoivat käyttää PHB:a samassa suhteessa kuin metaania. Tarvittaisiin jatkotutkimuksia osoittamaan, päteekö tämä poistamalla muita ravinteita ja kaikilla metanotrofipopulaatioilla. On kuitenkin mahdollista, että tässä työssä bakteerit eivät ottaneet PHB:a hiilenlähteekseen, kun osassa kasvatuksista metaani loppui. Tällöin nitraatiton kasvatusalusta olisi ehdottomasti paras PHB:n tuoton kannalta.

Wendlandt ym. (2001, 131) osoittivat, että poistamalla kasvatusalustasta ammonium, fosfori tai magnesiumin, saadaan suurin PHB-saanto fosforia rajoittamalla. Tässä tutkimuksessa fosforittomalla kasvatuksella saatiin kaikista alin PHB-pitoisuus. Fosfaatittomassa mediumissa ei ollut lainkaan puskuria, mutta pH:n muutokset olivat kaikissa mediumeissa vähäisiä. Fosforittoman mediumin pH oli hieman alempi kuin muiden sekä ennen inkubointia että niiden jälkeen. On todettu, että alhainen pH suosii tyypin II me-

tanotrofeja, jotka ovat tehokkaampia PHB:n tuotossa. PHB:n vähäinen määrä fosforittomissa kasvatuksissa ei todennäköisesti johtunut mediumin puskurin puuttumisesta tai alhaisesta pH:sta. Tämän voisi varmentaa tutkimuksilla, joissa tutkitaan puskurin ja pH:n vaikutuksia PHB:n saantoon.

Helmin ym. (2008, 1057) tutkimuksessa PHB-saanto oli suurin kaliumittomassa kasvatuksessa, jossa saatiin 0,45 grammaa PHB:a grammasta metaania. He tutkivat saantoa myös rikittömässä kasvatusalustassa, jossa saanto oli 0,40. Tässä tutkimuksessa saatiin PHB:a yli kaksinkertainen määrä rikittömässä kasvatusalustassa suhteessa kaliumittomaan. Tulosten huomattava poikkeavuus voi johtua käytetyn bakteeripopulaation lajikoostumuksesta tai siitä, että Helmin ym. (2008, 1057) kasvatukset tehtiin reaktoreissa eli avoimessa systeemissä. Tällöin bakteereilla on enemmän tilaa lisääntyä ja muita ravinteita enemmän käytössä.

Tässä tutkimuksessa ilman typen rajoittaminen ei edesauttanut PHB:n tuottoa eikä metaaninhapetusta. Bakteereilla oli käytössään selvästi vähemmän typpeä kuin normaalisti eikä ollenkaan nitraattia. Biomassaa syntyi enemmän kuin nitraatittomassa kasvatuksessa. Tämä osoittaa, että metanotrofit tarvitsevat ilman typpeä sekä PHB:n syntetisoimiseksi että biomassan kasvattamiseksi. Tässä tutkimuksessa ei analysoitu kasvatuspullojen typpi- tai hiilidioksididataa, mutta jatkotutkimuksissa voisi tutkia enemmän kaasufaasin muutoksia. Pieja, Rostkowski, Criddle (2011, 569) tutkivat typenlähteen vaikutusta PHB:n tuottoon. He kasvattivat metanotrofeja nitraatittomassa mediumissa typellisessä kaasufaasissa. Toisessa kasvatusmediumissa heillä oli nitraattia, mutta kasvatuksen kaasufaasi oli typetön. Tutkimuksessa ei kuitenkaan ollut kasvatusta, jossa sekä medium että kaasufaasi olisivat olleet typettömiä. He saivat samankaltaisia tuloksia kuin tässä tutkimuksessa todettiin: nitraatittomalla mediumilla PHB-saanto on selvästi suurempi kuin typettömässä kaasufaasissa.

Nitraatittomassa mediumissa PHB:a syntyi selvästi enemmän kuin muissa. Nitraatin määrän säätely on usein hyödynnetty menetelmä PHB:n tuottamisessa. Sitä on käytetty esimerkiksi monissa polymeerin tuottokokeissa, kun tutkitaan polymeerin molekyylipainoa ja eri lajien tuottotehokkuutta. Sen sijaan metaaninhapetus oli nitraatittomissa kasvatuksissa muita heikompaa, joten metaanipäästöjen hyödyntämisessä se ei ole tehokkain vaihtoehto.

Biomassan määrä oli magnesiumittomissa ja kaliumittomissa kasvatuksissa hieman korkeampi kuin muissa. Magnesium ja kalium ovat solujen makroravinteita, mutta niiden puuttuminen ei vaikuta solujen kasvuun yhtä voimakkaasti kuin typen. Nitraatittomissa kasvatuksissa biomassan määrä oli taas hieman pienempi kuin muissa. Nitraatti on solujen makroravinne ja ne tarvitsevat sitä paljon elääkseen. Kasvatuspullojen biomassamäärät olivat kuitenkin samaa luokkaa kaikissa. Tämä osoittaa, että biomassan määrä ei oleellisesti vaikuta syntyvän PHB:n määrään. Samaan päätyivät Pieja, Sundstrom ja Criddle (2001, 6015) tutkimuksessaan. He osoittivat, että tyypin II metanotrofi *Methylocystis parvus* ei kasvattanut solukonsentraatiotaan ennen kuin kasvatukseen lisättiin sekä nitraatti että metaani.

Tällä tutkimuksella ei saatu suoraa tietoa optimiolosuhteista PHB:n tuotantoon, koska lajikoostumuksesta ei ollut tarkkaa tietoa. Vertaamalla sulfaatin, magnesiumin, kaliumin, nitraatin ja fosfaatin poistamista kasvatusalustasta saadaan suurin PHB-saanto nitraatittomassa kasvatusalustassa. Hapetetun metaanin määrään ei vaikuta sulfaatin, magnesiumin, kaliumin tai fosfaatin poistaminen kasvatusalustasta. Niissä metaaninkulutus oli suunnilleen yhtä suuri kuin ravinteikkaassa NMS-mediumissa. Kaasufaasin typen rajoittaminen ei edesauta PHB:n tuottoa eikä metaanin hapetusta ainakaan, kun mediumista on poistettu nitraatti. Tämän tutkimuksen perusteella ei voida suoraan sanoa, että Tarastenjärven kaatopaikkamaan ja Koukkujärven kompostimaan bakteereilla voidaan tuottaa PHB:a *in situ*, mutta voidaan todeta, että ainakin joillakin kaatopaikka- maasta eristetyillä bakteerilajeilla on mahdollista tuottaa PHB:a metaanista.

Metanotrofit ovat kiinnostava bioteknologian tutkimuksen kohde, sillä niillä on suuri merkitys ilmastomuutosta edistävän metaanin hapetuksessa. Tämä tutkimus viittaa siihen, että metaania voitaisiin sitoa PHB:n tuotantoa varten metaanin syntypaikoilla. Tällöin se ei pääsisi vapautumaan ilmakehään ja PHB:n tuotto voisi sitoa kasvihuonekaasua sekä vähentää ilmaston lämpenemistä. Samalla saataisiin raaka-aineita biomuoveihin. Toisaalta PHB:a voitaisiin tuottaa myös ilman metanotrofeja ja nopeammin siirtämällä PHB-synteesiä koodaavia genejä muihin eliöihin. Edullisia vaihtoehtoja olisivat eliöt, jotka lisääntyvät ja kasvavat nopeasti pienellä panostuksella, kuten piilevät.

## LÄHTEET

- Asenjo, J. A., Schmidt, A. S., Andersen P. R. & Andrews B. A. 1995. Effect of Single Nutrient Limitation on Poly- P-Hydroxybutyrate Molecular Weight Distribution in *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnology and Bioengineering* 46, 497–502.
- Brandl, H., Gross, R., Lenz, R. & Fuller, C. 2005. Plastics from bacteria and for bacteria: Poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. *Microbial Bioproducts. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 41, 77–93.
- Braunegg, G., Lefebvre, G. & Genser, K. 1998. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology* 65, 127–161.
- Breitbarth E., Mills, M., Freidrichs, G. & LaRoche, J. 2004. Bunsen gas solubility coefficient of ethylene as a function of temperature and salinity and its importance for nitrogen fixation assays. *Limnology and Oceanography: Methods* 2, 282–288.
- Comeau, Y., Hall, K. & Oldham, W. 1988. Determination of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate and Poly- $\beta$ -Hydroxyvalerate in Activated Sludge by Gas-Liquid Chromatography. *Applied and Environmental Microbiology* 54 (9), 2325–2327.
- Doi, Y. 1997. Polyhydroxyalkanoates. Chapter 4, 79–86. Teoksessa Domb, A., Kost, J. & Wiseman D. (toim.) *Handbook of Biodegradable Polymers*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers.
- Hanson, R. S. & Hanson T. E. 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiological Reviews* 60 (2), 439–471.
- Hashsham, S. & Baushke, S. 2007. Energetics, Stoichiometry, and Kinetics of Microbial Growth. Chapter 13, 268–308. Teoksessa Reddy, C., Beveridge, T., Breznak, J., Marzluf, G., Schmidt, T. & Snyder, L. (toim.) *Methods for General and Molecular Microbiology*. 3<sup>rd</sup> Edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press.
- Helm, J., Wendlandt, K.-D., Jechorek, M. & Stottmeister, U. 2008. Potassium deficiency results in accumulation of ultra-high molecular weight poly-b-hydroxybutyrate in a methane-utilizing mixed culture. *Journal of Applied Microbiology* 105, 1054–1061.
- Khosravi-Darani, K., Mokhtari, Z.B., Amarii, T. & Tanaka, K. 2013. Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C<sub>1</sub> carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 1407–1424.
- Koch, A. 1981. Growth Measurement. Chapter 11, 179–207. Teoksessa Gerhardt, P., Murray, R., Costilow, R., Nester, E., Wood, W., Krieg, N. & Phillips, G. (toim.) *Manual of Methods for General Bacteriology*. Washington DC: American Society for Microbiology Press.
- Laurila, T. 2013. Metaanin vapautuminen ilmakehään suuri huoli. Ajankohtaista 2013. Ilmatieteen laitos. Päivitetty 11.10.2013. Luettu 3.11.2015.  
<http://ilmatieteenlaitos.fi/ajankohtaista/1229894>.

Maanoja, S. 2015. tohtorikoulutettava. Reaktorin maa-aines. Sähköpostiviesti. [susanna.maanoja@tut.fi](mailto:susanna.maanoja@tut.fi). Luettu 19.10.2015.

Matejtschuk, P. 2007. Lyophilization of Proteins. Teoksessa Day, J. & Stacey, G. Cryo-preservation and Freeze-Drying Protocols. 2<sup>nd</sup> Edition. Methods in Molecular Biology™. New Jersey: Humana Press.

McNair, H. & Miller, J. 2009. Basic GasChromatography. 2<sup>nd</sup> Edition. New Jersey: Wiley.

NCIMB. 2015. 131 Nitrate Mineral Salts (NMS) Medium. Growth Media Recipes. [pdf]. A microbiology and chemical analysis company. Päivitetty 20.3.2015. Tulostettu 16.10.2015. <http://www.ncimb.com/Files/GrowthMediaRecipes.pdf>.

Oehmen, A., Keller-Lehmann, B., Zeng, R., Yuan, Z. & Keller, J. 2005. Optimisation of poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorus removal systems. Journal of Chromatography A 1070, 131–136.

Pieja, A., Rostkowski, K. & Criddle, C. 2011. Distribution and Selection of Poly-3-Hydroxybutyrate Production Capacity in Methanotrophic Proteobacteria. Microbial Ecology 62, 564–573.

Pieja, A., Sundstrom, E. & Criddle, C. 2011. Poly-3-Hydroxybutyrate Metabolism in the Type II Methanotroph *Methylocystis parvus* OBBP. Applied and Environmental Microbiology, 6012–6019.

SFS-EN 14346. 2007. Jätteiden karakterisointi. Kuiva-ainepitoisuuden laskenta määrittämällä kuiva-ainejäännös tai vesipitoisuus. Suomen standardoimisliitto SFS.

Sudesh, K. & Abe, H. 2010. Practical Guide to Microbial Polyhydroxyalkanoates. UK: Smithers.

Wendlandt, K.-D., Geyer, W., Mirschel, G. & Al-Haj Hemidi. 2005. Possibilities for controlling a PHB accumulation process using various analytical methods. Journal of Biotechnology 117, 119–129.

Wendlandt, K.-D., Jechorek, M., Helm, J. & Stottmeister, U. 2001. Producing poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane. Journal of Biotechnology 86, 127–133.

Wendlandt, K.-D., Stottmeister, U., Helm, J., Soltmann, B., Jechorek, M. & Beck, M. 2010. The potential of methane-oxidizing bacteria for applications in environmental biotechnology. Engineering in Life Sciences 10 (2), 87–102.

Willey, J., Sherwood, L. & Woolverton, C. 2009. Prescott's Principles of Microbiology. 1<sup>st</sup> Edition. New York: McGraw-Hill.

Zhang, Y., Xin, J., Chen, L., Song, H. & Xia, C. 2008. Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular weight by methanotroph from methane and methanol. Journal of Natural Gas Chemistry 17, 103–109.

Zúñiga, C., Morales, M., Le Borgne, S. & Revah S. 2011. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) by *Methylobacterium organophilum* isolated from a methanotrophic consortium in a two-phase partition bioreactor. *Journal of Hazardous Materials* 190, 876–882.



**LIITTEET**

1 (2)

## Liite 1. NMS-kasvatusmedium (NCIMB 2015)

## Liuos 1. 10x NMS salts

$\text{KNO}_3$	10,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	10,0 g
$\text{CaCl}_2$	2,0 g

Laimennetaan vedellä litraksi.

## Liuos 2. FeEDTA

FeEDTA	3,8 g
--------	-------

Laimennetaan vedellä 100 millilitraksi.

## Liuos 3. Natriummolybdaatti

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,26 g
--	--------

Laimennetaan vedellä litraksi.

## Liuos 4. Hivenaineet

$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	1,000 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2,500 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2,000 g
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,075 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,250 g
EDTA dinatriumsuola	1,250 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,100 g
$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,050 g

Laimennetaan vedellä 5 litraksi.

## Liuos 5. Fosfaattipuskuri

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	71,6 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	26,0 g

Liuota noin 800 millilitraan vettä, säädä pH 6,8 ja laimenna litraksi.

## NMS-mediumin valmistus

2 (2)

1. Laimenna 100 ml liuosta 1 litraksi.
2. Lisää 1 ml liuosta 3 ja 1 ml liuosta 4.
3. Lisää 0,1 ml liuosta 2.
- (4. Lisää 1,5 % agaria maljoja varten.)
5. Autoklavoi 15 psi 15 minuuttia.
6. Autoklavoi erikseen 10 ml liuosta 5.
7. Kun NMS on jäähtynyt, lisää siihen aseptisesti liuos 5. Jos lisäys tehdään liian aikaisin, fosfaatti saostuu.

## Liite 2. Kasvukäyrän määrittelyn absorbanssit

TAULUKKO 10. Kasvukäyrän määrittelyn ajanhetket ja mitatut absorbanssit

$t$ h	$A$
0	0,25220
	0,25049
	0,25659
2	0,31592
	0,32056
	0,31335
4	0,35942
	0,36077
	0,35625
6,7	0,39331
	0,39355
	0,37903
8	0,41458
	0,42141
	0,40078
25	0,50250
	0,49896
	0,50165
27,8	0,50070
	0,49374
	0,49423
29,7	0,52847
	0,54397
	0,51614
48,3	0,53540
	0,53210
	0,53198

## Liite 3. Optisen tiheyden standardisuoran määrittämisen absorbanssit

TAULUKKO 11. Optisen tiheyden standardisuoran laimennosten kuivapainot ja absorbanssit

Näyte	A	$m_{\text{biomassan kuivapaino}}$ mg	$C_{\text{biomassa}}$ mg/l
10 % a	0,17206	40,3	403
	0,17133		
10 % b	0,15619	39,9	399
	0,16241		
25 % a	0,39594	48,3	483
	0,40021		
25 % b	0,4057	48,6	486
	0,40289		
50 % a	0,75006	63,0	630
	0,77325		
50 % b	0,75629	62,6	626
	0,71259		
75 % a	1,03351	75,7	757
	1,0318		
75 % b	1,05878	76,2	762
	1,04169		

## Liite 4. Mediumien pH:t ja sähkönjohtavuudet

TAULUKKO 12. PHB:n tuottokokeissa käytettyjen kasvatusliuosten pH:t ja sähkönjohtavuudet mittauksen alussa ja lopussa, jolloin laskettu kolmen rinnakkaisen pullon keskiarvo

	pH		$\sigma$ (mS/cm)	
	Alussa	Lopussa	Alussa	Lopussa
$\text{SO}_4^{2-}$	6,89	6,45	2,88	2,27
$\text{Mg}^{2+}$	6,83	6,60	3,06	2,46
$\text{K}^+$	7,09	6,70	3,05	2,33
$\text{PO}_4^{3-}$	6,95	6,64	2,66	2,03
$\text{NO}_3^-$	6,75	6,52	2,78	2,06
$\text{N}_2$	6,89	6,44	2,88	2,03
NMS	6,80	6,72	2,91	2,04

Liite 5. Hapetetun metaanin määrä ja biomassasta uutetun PHB:n konsentraatio kasvatuspulloittain

TAULUKKO 13. Hapetetun metaanin määrä ja uutetun PHB:n konsentraatio kasvatuspulloittain

	$n_{\text{CH}_4}$ μmol	$C_{\text{PHB}}$ mg/l
$\text{SO}_4^{2-}$	676,6	-
	712,4	245,1
	683,0	242,0
	635,7	207,1
$\text{Mg}^{2+}$	830,1	-
	820,4	123,5
	841,3	143,9
	734,0	129,2
$\text{K}^+$	849,3	-
	868,6	137,0
	857,8	136,7
	892,1	130,4
$\text{PO}_4^{3-}$	801,3	-
	827,8	74,8
	821,7	69,5
	846,1	75,9
$\text{NO}_3^-$	423,0	-
	309,2	266,6
	274,9	267,9
	395,6	228,1
$\text{N}_2$	460,3	-
	433,7	210,7
	437,5	200,6
	426,4	193,4
NMS	725,2	-
	754,3	0,0
	732,1	0,0
	696,7	0,0